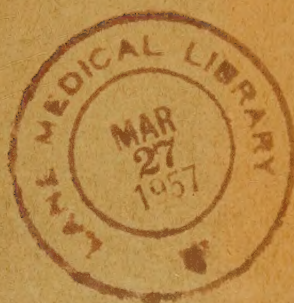


Gottungen

Theris

1953

by Heinrichs



With gratitude and compliments

Eberhard Heinichs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154024_0480

Aus der Universitäts-Frauenklinik zu Göttingen

Direktor: Professor Dr. H. M a r t i u s .

Über das Vorkommen und die Bedeutung
der Spermatheyaluronidase.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Hohen Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität

zu Göttingen

Vorgelegt im Juli 1953

von

Eberhard Heinrichs

aus Hannover

Göttingen 1953.

V.) Der Hyaluronidase-Transport im weiblichen Genitaltrakt.

- a) Der Hyaluronidase-Transport durch die Spermien.
- b) Der Spermientransport durch Uterus und Tube.
- c) Weitere Theorien über den Hyaluronidase-Transport.

VI.) Die Wirkung der Hyaluronidase am Ei.

- a) Die Wirkung des Samens auf das Ei.
- b) Befruchtungen ohne komplette Lösung des Ovocumulus.
- c) Die fertilen und sterilen Kopulationen beim Kaninchen.
- d) Die Zahl der zur Befruchtung notwendigen Spermatozoen.
- e) Die Notwendigkeit grosser Spermienzahlen am Ei.
- f) Die Wirkung von Hyaluronidase-Gaben zum Samen.
- g) Die Wirkung der Hyaluronidase bei der Frühentwicklung des Eies.
- h) Zusammenfassung.

VII.) Der Tubalfaktor.

- a) Die Lösung der Corona-radiata-Zellen.
- b) Die Natur des Tubalfaktors.

VIII.) Die antikonzeptionelle Wirkung von Hyaluronidase-Inhibitoren.

- a) Die Inhibitionswirkung von Blut und Serum.
- b) Die Erzeugung von Antikörpern.
- c) Die Hemmung der Fermentaktivität durch Hyaluronsäure-Derivate.
- d) Die Wirkung von phosphoriliertem Hesperidin.
- e) Die Wirkung von Salicylsäure und ihren Derivaten.

1. Die Hyaluronidase-Theorie der durch den
Hyaluronidase-Mangel verursachten Sterilität.
a) Die männliche Faktor.

b) Erfolge und Misserfolge der Hyaluro-
nidase-Behandlung.

c) Die Theorie von der Geschlechtsverteilung
nach de Rudder.

d) Die Indikationen für die Sterilitäts-
bekämpfung durch Hyaluronidase.

2. Zusammenfassung der Literatur.

3. Über den Hyaluronidase-Gehalt von Bullen- und Men-
schensperma und die Wirkungen dieses Fermentes auf
die Spermatozoen.

Eigene Untersuchungen.

Fragestellung.

Thema: Der Hyaluronidase-Gehalt von Bullen- und Men-
schensperma und die Wirkungen dieses Fermentes
auf die Spermatozoen.

1. Untersuchungen am Bullensperma.

a) Das untersuchte Material.

b) Die Technik des Spermioigrammes.

1.) Grobsinnliche Prüfung.

2.) Spermienzählung.

3.) Beurteilung der Beweglichkeit.

4.) Resistenzbestimmung an den Sper-
mien.

5.) Unterschiedsfärbung zwischen to-
ten und lebenden Spermien nach
Morosow und Blom.

6.) Untersuchung der Spermienlebens-
dauer.

7.) Morphologische Untersuchung.

c) Die Methodik der Hyaluronidase-Gehalts-
bestimmung.

1.) Geräte.

2.) Chemikali-
en.

3.) Die Herstellung der Lösungen.

- 4.) Die Bestimmung des Viskositäts-
koeffizienten.
- 5.) Beschreibung eines Versuches zur
Hyaluronidase-Gehaltsbestimmung.
- 6.) Berechnung des Viskositätskoeffizienten.
- 7.) Festsetzung einer Einheit.
- 8.) Fehlerbreite und Beeinflussung
durch Variationen.
- d) Die Ergebnisse der Untersuchung.
- 1.-12.) Erklärung der erhaltenen Spermio-
gramm-Durchschnittswerte.
- 13.) Der Korrelationskoeffizient.
- 14.) Der mathematische Trend.
- 15.) Folgerungen aus dem Kurvenverlauf.

II.) Untersuchungen am Menschengesamtheit.

- a) Das untersuchte Material.
- b) Die Technik des Spermio-
gramms.
- 1.) Grobsinnliche Prüfung.
- 2.) Beurteilung der Beweglichkeit.
- 3.) Beurteilung der Beweglichkeit.
- 4.) Resistenzbestimmung an den Sper-
mien.
- 5.) Unterschiedsfärbung zwischen to-
ten und lebenden Spermien nach
Toruella-Balman.
- 6.) Untersuchung der Spermienlebens-
dauer.
- 7.) Morphologische Untersuchung.
- c) Die Modifikation der Hyaluronidase-Ge-
haltsbestimmung für das menschliche
Sperma.
- d) Die Ergebnisse der Untersuchung.
- 1.- 11.) Erklärung der erhaltenen Spermio-
gramm-Durchschnittswerte.
- 12.) Schilderung zweier Patienten mit
einer Aspermie.
- 13.) Der Korrelationskoeffizient.
- 14.) Der mathematische Trend.
- 15.) Folgerungen aus dem Kurvenverlauf.

III.) Diskussion der Ergebnisse

- a) Die Hyaluronidase-Aktivitätshängigkeit von der Temperatur und der Ionenkonzentration.
 - 1.) Temperaturabhängigkeit.
 - 2.) Abhängigkeit von der Ionenkonzentration.
- b) Die Hyaluronidase-Gehaltsabhängigkeit von der Aktivität der Spermatozoenkonkurrenz.
 - 1.) Literaturangaben.
 - 2.) Ergebnisse aus der Zusammenstellung.
- c) Der Einfluss des Fernertgehalts zwischen Hühner und Menschen.

IV.) Die Wirkung der Hyaluronidase auf die Lebensdauer des Spermatozoen.

- a) Die Methodik der Untersuchung.
- b) Die Ergebnisse des Versuches.
- c) Die Diskussion der Ergebnisse.

V.) Der Nachweis der Aufnahme von Hyaluronidase durch die Spermatozoen.

- a) Die Methodik der Untersuchung.
- b) Die Ergebnisse der Versuche.
 - 1.) Der Hyaluronidase-Gehalt im Samenflüssigkeit und der Waschflüssigkeit.
 - 2.) Die Aktivität der Hyaluronidase aus den Spermatozoen.
 - 3.) Die Aufnahme von Hyaluronidase durch die Spermien.
- c) Diskussion der Ergebnisse.
- d) Die Angaben aus der Literatur.

C. Schluss: Zusammenfassung

D. Anhang : Literaturverzeichnis.



Die vorliegende Arbeit soll im ersten Teil einen Überblick an Hand der Literatur über die bisher bekannten Ergebnisse der Hyaluronidase-Forschung auf den Zusammenhang der Befruchtung geben.

Im zweiten Teil wird über Untersuchungen berichtet, die dazu dienen sollten, noch bestehende Lücken in den Fragen der Abhängigkeit des Befruchtungserfolges von der Hyaluronkonzentration und der Wirkung der Hyaluronidase auf die Spermatozoen zu schliessen.

Die Fermentchemie des Samens.

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die Fermentforschung in steigendem Maße der Untersuchung des Spermas gewidmet mit dem Ziel, unklare Fälle von steriler und männlicher Sterilität zu erforschen.

Mit den Arbeiten von D u r a n - R e y n a l s 1928 (45), H o f f m a n n u. Mitarb. 1930 (81), Y a m a n e 1930 (253) und M c C l e a n 1930 (127) begann dies Gebiet in der Sterilitätsforschung eine immer grössere Rolle zu spielen, es ist jedoch bis heute noch nicht gelungen, ausreichende Kenntnisse über die spermatischen Fermente zu erhalten, weil die Untersuchungsverfahren zu schwierig und die Ergebnisse zu widersprechend sind.

Bisher wurde im Sperma neben der Mesomucinasase, die als Hyaluronidase (Hd) bekannt ist, auch noch Pepsinogen (121) und ein proteolytisches Enzym mit einer Aminopeptidase (120) durch L a n d a u i s t u. Mitarb. eine Phosphatase durch K u t s c h e r u. Mitarb. (107), M c L e o d u. Mitarb. (136), G o m o r i (66), und R i s s f e l d t (170),

peptid- und ein tryptophanähnliches Ferment durch *W a l l e n f e l s* (46) und eine Keratinase durch *W a l l e n f e l s* (124), eine Diastase durch *W a l l e n f e l s* (146), eine Aminooxydase (Histaminase) eine Cholinesterase durch *J o e l* (88) nachgewiesen.

Diese Enzyme kommen im Samen der Säugetiere in wechselnder Menge und unterschiedlicher Verteilung vor. Über ihre Bedeutung kann nur wenig ausgesagt werden. Nur die H₃ ist bekannter geworden.

Auf eine Gesamtübersicht des Fermentes H₃ sei hier verzichtet und auf die Arbeiten von *W a l l e n f e l s* (22), *M e y e r* (138), *W e h r l e* u. Mitarb. (224), *W a l l e n f e l s* (59), *B r e u* (23), *E u l e n e n* (102), *T h u r m a n n* (211), *S a x i n g e r* (189), *R ö s s i n g* (164), *W o l f f* (232), und *B o l t r a f f i o* (11) verwiesen.

Die H₃ ist nach *R o g e r s* (179) ein Fermentkomplex, ist spezifisch auf die Hyaluronsäure wirkt. Hyaluronsäure ist ein Aminopolysaccharid, das zu gleichen Teilen aus Azetylglukosamin und Glukuronsäure besteht und den Hauptbestandteil des extraembryonalen und normalen Mesoderms darstellt. Sie findet sich nach *G i b b i n* (59) im wesentlichen in der extrazellulären Kittsubstanz der Epithel- und Endothelzellen.

Die erste Mitteilung über die H₃-Wirkung findet sich bei *W a l l e n f e l s* (114), der feststellte, daß auch in vitro Suspensionen die der H₃ enthaltenden Cumulus-Zellen in vitro unter Zeit abgelöst werden. Später beschreiben *R o f f e* u. Mitarb. (81) die beschleunigte Ausbreitung von Farbstoffen in der Haut bei Zugabe von Spermaextrakten. Ähnliches Verhalten beobachtet *W a l l e n f e l s* (147) bei der Lockerung von Viren und Toxinen in Verbindung mit Hodenextrakten.

Y a m a n e (233) fand als erster, daß schon kurz nach der Operation zwischen den befruchteten und unbefruchteten Eiern des Kaninchens ein Unterschied besteht. Er wies nach, daß unter der Einwirkung von arteigenen und artfremden Spermiasuspensionen, sowie gering konzentrierten Trypsialösungen eine Lockerung in den Cumulus-Zellen sichtbar und das

aufteilung zur Bildung des zweiten Polkörper-
+ sind.

Die vielen Untersuchungen sichergestellt war,
konzentration im Hoden am grössten ist, wurde die
biologische Bedeutung des Fermentes erforscht, das durch seine
konzentration im Hoden auf eine Zeit

Levan und Rowlands (189) formulierten
1942 eine neue Befruchtungstheorie, nach der die Cu-
lus- und Corona-radiata-Zellen, die bei der Ovulation dem
anhaften und durch Hyaluronsäure als Kittsubstanz verbunden
sind, durch die im Sperma vorhandene Hd abgelöst werden
und dadurch den Spermatozoen die Imprägnation und die Be-
fruchtung ermöglichen.

Diese Theorie blieb nicht unwidersprochen. Im Folgenden
sei das Für und Wider abgewogen.

Der Hd-Nachweis im Samen gelang Swyer (204) bei
Kaninchen, Bullen, Ebern und Menschen, Dalggaard-
Mikkelsen (35) bei Meerschweinchen, Mäusen und
Flehen, Rowlands (184) bei Ratten und Schafen. Of-
fen blieb die Frage des Vorhandenseins von Hd im Sperma von
Hunden, Pferden, Eseln und Hähnen durch sich widersprechende
Untersuchungen von Swyer (204, 207), Boltraff-
fio (19, 20), Dalggaard-Mikkelsen (35),
Willi (56), Rowlands (184) und Vigg-
er (218). Dagegen fehlt nach Swyer (207),
Lange (184), Viggier (218) und
Lange (184) Hd beim Opossum, bei Amphibien und Rep-
tilien.

Swyer (207) und Wallenfels (223) ver-
muten, daß dies Enzym eine späte Errungenschaft in Evolu-
tionsprozess ist, erworben beim Übergang vom Wasser- zum
Landleben, denn es konnte bisher sicher nur bei Säugetieren
nachgewiesen werden, nachdem der Hüllhüllenlösende Faktor des
Hoden-Hüllhüllen-Lösers (HLL) u. Sinterb (195)
nachgewiesen wurde. Dieser Faktor wurde von
Lange und Monroy u. Sinterb. (197) berichtet.

Aber auch bei den Säugern ist das Vorkommen eines (Pro-)
mulus nicht regelmässig, auch nicht in Verbindung mit H3
in perma.

III) Bildung der Hyaluronidase im H

Die Art der Hd-Bildung hat viele Untersucher beschäf-
tigt. Eine direkte Abhängigkeit zum jeweiligen Funktionszu-
stand des Hodenkeimepithels wurde von L e o n a r d u. Mitarb. (115), S w y e r u. Mitarb. (209), K u l o n e n (101), R i i s f e l d t (174), S t a r y u. Mitarb. (197), C a d i l l i u. Mitarb. (24), D a l g a a r d - M i k k e l s e n (35) und F a v i l l i (56) gefunden.

In der Vorpubertät konnten L e o n a r d u. Mitarb. (112) an Mäusen Hoden keine, bei Ratten (115) erst vom 21. Lebenstag, D a l g a a r d - M i k k e l s e n (35) erst bei Versuchstieren von 76 g Gewicht Hd nachweisen. Da jedoch die Spermiogenese bei Ratten erst nach 97 g Gewicht einsetzt, wurde eine Diskrepanz sichtbar, die auch von R i i s f e l d t (171, 172, 173, 175) und K u l o n e n (101, 102) erwähnt wird, die Hd bereits vor Auftreten der Spermatogonien fanden. Daraus wird nun geschlossen, daß die Hd-Bildung in den Hodenstützzellen gebildet und dann während der Ausbildung der Spermatozoen von diesen übernommen wird. Von R i i s f e l d t (171) wurde beim Auftreten der Spermatozoen im Hoden ein wesentlich stärkerer Gehalt des vorher schon vorhandenen Fermentes beobachtet. Er selbst (174) verlegt allerdings die Produktion in die Spermatozoen. K u l o n e n (101) glaubt, daß die Hd-Bildung nicht an die Spermiogenese allein gebunden sei.

M i c h e l s o n u. Mitarb. (144) schildern hierzu den Fall eines Patienten, dem wegen eines Hodencarcinoms der rechte Testis entfernt wurde und der dann über 20 Röntgen-tiefenbestrahlungen erhielt. Bei einer Biopsie des linken Hodens nach Jahren waren in den Tubuli seminiferi die Sertolizellen die einzigen zellulären Elemente. In der Biopsie enthält, schlossen sie auf die Vermehrung im Sertolizellensyncytium. Auch K l e c k e r (98) kommt zum gleich-

Ergebnis.

M i c h e l s o n u. Mitarb. (144) konnten bei 17 von 31 Ejakulaten mit einer Aspermie Hd nachweisen. C i u l l a u. Mitarb. (34) beschreiben 8 Patienten mit messbarem Hd-Gehalt, die nach dem Hodenresektat sich nicht mehr messbar ergaben. Diese Autoren gehen eingehend darauf ein, daß das Ferment Bestandteil des Prostatasekretes sei. B a l l e r i o u. Mitarb. (5) wiesen bei 9 Aspermien in 4 Fällen Hd nach.

Jede Störung der normalen Hodenepithelausbildung beeinflusst die Bildung des Prostatasekretes. So konnten von L e o n a r d u. Mitarb. (115), F a v i l l i (56) und S t a r y u. Mitarb. (197) keine Hd nachgewiesen werden. Die Hypophysektomie läßt die Hd-Bildung fast ganz absinken, wie es von L e o n a r d u. Mitarb. (112, 113) S t a r y u. Mitarb. (197) und S c o t t (191) beobachtet wurde. Während sich die Thyreodektomie nach L e o n a r d u. Mitarb. (111) nicht auf die Fermentbildung im Hoden auswirkt, läßt eine vollständige Kastration den Hd-Gehalt nach S c o t t (191) reversibel sinken.

Allgemeine Abhängigkeiten bestehen nach P e r l o f f u. Mitarb. (158) zwischen dem Hd-Gehalt des Hodens und seinem Gewicht, dem Alter des Patienten, seiner Körpergröße und dem Zellenreichtum der Tubuli seminiferi. Rassenabhängigkeiten wurden nicht beobachtet.

Der Einfluss der akzessorischen Drüsen und ihrer Sekrete auf den Hyaluronidase-Gehalt des Spermas.

Der Einfluss der akzessorischen Drüsen und ihrer Sekrete ist oft diskutiert worden.

Wenn im Sekret der Prostata und Vesikulardrüsen durch L e o n a r d u. Mitarb. (115) Hd gefunden wurde, so leiten sie selbst und F a v i l l i (56) dies als Diffusion, denn im Drüsengewebe konnte ein solcher Befund nicht erhoben werden. Durch Untersuchungen von M c C l e a n u. Mitarb. (129), S w y e r (204) und B e r g e n s t a a l u. Mitarb. (13) wurde dieses bestätigt.

C i u l l a u. Mitarb. (34) wiesen im Ejakulat von 3 Männern mit einer Aspermie Hd nach. Die Autoren schließen

Wirds, daß das Enzym im Prostatasekret enthalten sei, kann man aber andererseits nicht angeben, ob die spermaleitenden Kanäle stets verschlossen waren, wodurch sich Fehlerquellen ergeben würden.

Abweichend von der allgemeinen Meinung verlegt B e l o u s c h k i n (10) die Fermentproduktion in die Nebenhöhle, ohne daß dafür der experimentelle Nachweis erbracht wird.

F a v i l l e r (220) versuchte färberisch Hyaluronsäure im Prostatagewebe nachzuweisen, allerdings sind die verwandte Technik und ihre Ergebnisse nicht überzeugend.

H a n g (27) weist auf die Wichtigkeit der akzessorischen Sekrete bei der Befruchtung hin. B e r g e n - s t a a l u. Mitarb. (13) und M o o r e (148) beobachteten durch diese Sekrete eine Förderung der Enzymfreisetzung aus den Spermien, was von F e r l m a n n u. Mitarb. (155) mit den unphysiologischen Bedingungen übereinstimmt, wenn die Spermien isoliert untersucht sind.

Die Hyaluronidase im Samen.

Zum Verständnis der Hd-Wirkung ist es notwendig zu wissen, ob das Ferment in die zellulären Anteile des Ejakulates oder in die extrazelluläre Fraktion übergeht. H e c h t e r - C l e a n (129) fand Hd in den Spermatozoen und im Samenplasma, wenn der Ejakulatextrakt mittels HgCl₂ aufgeschüttelt wurde. Des Weiteren wurde Hd im Samenplasma durch J o h n s t o n u. Mitarb. (92, 94) beim Bullen, durch H e c h t e r u. Mitarb. (78), B e r g e n - s t a a l u. Mitarb. (13) und F a v i l l e r (155) beim Menschen nachgewiesen werden.

Das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärem Ferment verändert sich dann laufend zu Gunsten von letzterem; so wurde von F e r l m a n n u. Mitarb. (155) für Ratten, von D a l g a a r d - M i k k e l s e n u. Mitarb. (35, 37) und J o h n s t o n u. Mitarb. (92) für Bullen und B e r g e n s t a a l u. Mitarb. (13) und F a v i l l e r (155) für den Menschen ein Ansteigen der extrazellulären Hd beobachtet, bei gleichzeitigem Abfall der Motilität der Spermatozoen.

Daß dies keine aktive Enzymproduktion durch die tozoen, sondern eine Diffusion präformierter Hd in die umgebende Flüssigkeit ist, wurde von S w y e r (205), P e r l m a n u. Mitarb. (155), J o h n s t o n u. Mitarb. (92), die auch die Frage eines Proenzymas untersuchten, von D a l - g a a r d - M i k k e l s e n u. Mitarb. (37), B e r g e n s t a a l u. Mitarb. (13), G r e e n b e r g u. Mitarb. (68) und F a v i l l i (56) sichergestellt.

P e r l m a n u. Mitarb. (155) glauben, daß widerstandsfähigere Spermien in der gleichen Zeiteinheit weniger Ferment in die Umgebung diffundieren lassen und meinen damit, wie auch F a v i l l i (56), daß nur sterbende Spermatozoen ihre Hd freigeben. Zu dem gleichen Ergebnis, daß nämlich die Hd zunächst in der Spermatide gehalten ist und daß diese mit der Zeit ein Gleichgewicht mit der extracellulären Hd zustrebt, kamen auch V e n d r a m i n i u. Mitarb. (217) durch ihre Untersuchungen.

Aus der Interpretation unserer Versuchsergebnisse, sowie der von E m m e n s u. Mitarb. (50) glauben wir schließen zu können, daß zwischen den Spermatozoen und der Samenflüssigkeit ein labiles Fermentgleichgewicht herrscht, das bei lebenden Spermien stark zu ihren Gunsten verschoben ist. Sterben die Spermien ab, entweder physiologisch nach einer gewissen Lebensdauer oder durch unphysiologische Einwirkungen wie etwa hohe Verdünnung oder Gefrieren bei der Fermentextraktion, dann steigt der Enzymgehalt der Spermaflüssigkeit, wie dies auch von P e r l m a n u. Mitarb. (155) und F a v i l l i (56) vermutet wurde.

Eine besonders hohe Fermentkonzentration in den Spermien läßt sich leicht nachweisen. Nach A e h n e l t (1) entfallen beim Bullen auf den Zellenanteil des Spermas bei einer Spermienkonzentration von 20 Millionen Spermatozoen pro ccm etwa 13 Gewichtsprozent. In der ersten Stunde nach der Ejakulation fanden D a l g a a r d - M i k k e l s e n u. Mitarb. (37) jedoch 45 %, S w y e r (205) sogar 75 % des Gesamt-Hd-Gehaltes des Ejakulates an die Spermatozoen gebunden.

Für den Menschen errechneten K u r z r o k u. Mitarb. (105) bei einer Spermienkonzentration von 100 Millionen Spermatozoen pro ccm für den zeitigen Anteil des Ejakulates 16 Gesichtspozent. B e r g s t r a s s u. Mitarb. (13) wiesen nach, daß 20 min nach der Ejakulation jedoch 59 % vom 4-Stunden-Hd-Gehalt des Ejakulates in den Spermien enthalten war.

Auf die strenge Abhängigkeit des Hd-Gehalts von der Spermienkonzentration kann hier nicht näher eingegangen werden, sondern es sei auf die ausführliche Darstellung im zweiten Teil verwiesen, wie sie im Anschluß an eigene Versuche gegeben wird. Dort wird auch die Frage einer Hypothese bei normaler Spermienzahl besprochen.

Der Hyaluronidase-Transport im weiblichen Genitaltrakt.

Die Frage, wie das Ferment aus der Vagina bzw. der Cervix an den Ort der Befruchtung, d.h. an das obere Tubenende gelangt, konnte bisher noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden.

Einwandfrei bewiesen wurde bisher nur der Transport durch die Spermatozoen selbst. Dieser Mechanismus wurde von R o w l a n d s (183), L e o n a r d u. Mitarb. (114), S a l l m a n n (135), K u r z r o k u. Mitarb. (106) und P o l l a k (165) vermutet. Ihre Ansicht wird durch die Versuche über die Aufnahme der Hd durch die Spermatozoen von E m m e n s u. Mitarb. (50) und jene, die im zweiten Teil geschildert werden, gestützt.

Eine intrakanalikuläre Ausbreitung des Fermentes durch Diffusion wurde schon von R o w l a n d s (183) und von L e o n a r d u. Mitarb. (114) nicht angenommen.

Für die Möglichkeit des Hd-Transportes durch die Spermien spricht ferner, daß die Spermienwanderung schneller geschieht, als man es sich gemeinhin vorstellt. C h a n g (32) berichtet, daß menschenspermatozoen von der Vagina bis zum ampullären Tubenende vier Stunden Zeit gebrauchen.

V a n D e m a r k u. Mitarb. (39) fanden schon 11 min nach der Insemination Spermatozoen am Infundibulum der Kuh, L e -

W i s u. Mitarb. (116) wiesen sie 15 min nach der Kopulation am oberen Tubenende der Maus, W h i t n e y (229) nach 20 min am Ovar der Hundin nach, wobei sie durch die Beweglichkeit in einer solchen Zeit nicht gekannt sein konnten. S t u r g i s (202) konnte zeigen, daß auch die Tubenfunktion für die Aszension menschlicher Spermien einen wesentlichen Anteil hat, vielleicht durch die Erzeugung eines der Spermienwanderung entgegengerichteten Flüssigkeitsstromes. M a r t i u s (126) hält eine Mitwirkung der Tubenmuskulatur bei der Spermienas2ension für möglich. Von G r e e n b e r g u. Mitarb. (67, 68) werden vaginale und zervikale Kontraktionen für den Samenflüssigkeits- und Spermientransport angenommen. Hd war bereits eine Minute nach der Kopulation in der Ampulle der Tube des Kaninchens nachweisbar.

Hier beginnt die alte Streitfrage, inwieweit der Orgasmus den Spermientransport und somit die Befruchtung erleichtert. B e l o n o s c h k i n (9, 10, 11) und K. W. S c h u l t z e (190) bejahen diese Frage, M a r t i u s (126) hält sie nicht für ausschlaggebend, K u r z r o k (106) lehnt eine Aspiration der Spermien ab.

Weitere Theorien über den Fermenttransport sind die von S a l l m a n n u. Mitarb. (187), die vermuten, daß die Hd, in der Vagina resorbiert, durch den Blutstrom an den Ort ihrer Wirksamkeit gebracht wird; ferner wird von K u r z r o k u. Mitarb. (106) die Möglichkeit erwähnt, daß in der Cervix eine selektive Resorption und in der Tuben-Mukosa eine selektive Sekretion stattfindet, jedoch spricht gegen beide Theorien die Inhibitionswirkung des Blutserums, wie sie von F e k e t e u. Mitarb. (57), L e o n a r d u. Mitarb. (110) und H a d i d i a n (69) gezeigt wurde. Aus diesen Grunde wird auch von F a v i l l i (56) diese Möglichkeit verworfen.

Der normale Seruminhibitorspiegel gegenüber Hd ist nach den Untersuchungen von G l i c k u. Mitarb. (64) bei rheumatischer Arthritis noch erhöht (236).

Nach K u r z r o k u. Mitarb. (106) kann vielleicht auch eine wesentliche Hd-Lesion in der Tube erfolgen, an-

... in Endprodukte, wie sie beim Hyaluronsäure-Abbau
... eine geringe Menge Hd auftreten, die für sich allein
... ausreicht, die Follikelzellen abzulösen.

Der Versuch von B o l t r a f f i o (22) den Per-
... transport in der Tube zum Ei experimentell aufzuklären,
... nicht zu einem befriedigenden Ergebnis

Die Wirkung von Hyaluronidase auf Hd.

Y a m a n e (233, 234) berichtet, daß durch die
... Wirkung von Hyaluronidase (Lange, 1930) ...
... die Denudation des Eies von den adhärenenten Cumuluszellen
... die interzellulär durch Hyaluronsäure verkittet sind,
... F e k e t e u. Mitarb. (57) nachwiesen. Ferner wird
... die Eizelle zur Polkörperchenbildung angeregt, was später
P i n c u s u. Mitarb. (162) bestätigten.

Wenn auch für Trypsin eine ähnliche Wirkung beschrie-
ben wurde, so konnte doch die Verschiedenheit der Fermentak-
tion durch die Beobachtung der Andauung des Eies durch Tryp-
sin von P i n c u s u. Mitarb. (162) und F e k e t e
(57) erkannt werden.

Diese Denudation ist, wie Versuche in vitro gezeigt ha-
ben, nicht an artspezifische Hd gebunden. Untersuchungen von
M c C l e a n (129), P i n c u s u. Mitarb. (162), Y a -
m a n e (233, 234) und F e k e t e u. Mitarb. (57) ha-
ben dies nachgewiesen. Die Verwitterung des Spermatozoon, nach
abgetöteter, ist für diesen Vorgang nicht notwendig, wie es
von S w y e r (206) und G i l c h r i s t u. Mitarb. (62)
beobachtet wurde. Damit wird auch gleichzeitig die Annahme
von L o n g (117), daß es sich um eine mechanische Wirkung
der Spermatozoonbewegung handelt, widerlegt, was auch von
P i n c u s u. Mitarb. (162) und Y a m a n e (234) ex-
perimentell bestätigt wurde.

Die Befreiung des Eies von den Cumuluszellen als unab-
dingbare Voraussetzung für die Penetration und damit die Be-
fruchtung wurde von S w y e r (203), R o t h s c h i l d
(181), J o e l u. Mitarb. (87, 88, 89), S t a r y u.
Mitarb. (197), K l e c k e r (98), F e k e t e u. Mitarb.

am Ei zu entscheiden. Es ist jedoch bisher weder durch
Beobachtung, noch durch Tierversuche wahr-
scheinlich zu machen, denn nach C h a n g (32) ist das Ver-
hältnis der das Ei erreichenden Spermien zu jenen, die in der Ver-
einerung teilnehmen, beim Kaninchen 1 : 100 000, bzw. (31)
im menschlichen Bereich 1 : 500 bis 1 : 200 000. Ähnliches be-
zogen auf die menschliche Befruchtung.

Rowland (183), daß die Spermienkonzentration
am Ei ausreichen könnte, die Denudation durchzuführen, könn-
te also nicht gesichert werden.

Diesen Befunden trägt auch die Erklärung von C h a n g
(29) Rechnung, der glaubt, daß es sich um eine partielle
Lösung von Cumuluszellen handeln könne, bzw. daß die Hd ei-
ne einzelne Spermatozoon befruchten, um dieser die Möglich-
keit der Denudation zu ermöglichen.

Daß größere Spermienzahlen in Spermatozoen-Strich-
fängungsproben zeitigen, ist eine klinische Erfahrung. Im
Lahmen der 'Spermatozoen' wurde bereits erwähnt, diese ge-
habten dahingehend erläutert, daß sie die notwendige Hd-Kon-
zentration am Ei sicherstellen sollen, wie dies von M c -
C l e a n u. Mitarb. selbst (129), S a l l m a n n (185),
R o t h s c h i l d (181), H e c h t e r u. Mitarb. (78)
u. K l e c k e r (98) vertreten wurde.

V i v i e n (219) hält die Wirkung der Hd bei der
Befruchtung für unwichtig im Gegensatz zum sog. Putermilieu.
Dieser ist aber nach der oben erwähnten Theorie nicht ab-
trennbar nach der Kopulation, sondern erst nach der
Wirkung am Ei entgangen ist.

Daß die Hd aber bei der Befruchtung auch eine Rolle
spielt, die unabhängig von der Spermatozoon ist, haben
S a l l m a n n u. Mitarb. (187) nachgewiesen. Sie fanden
ähnlich einer größeren Korrelation zwischen der Hd-
Konzentration vom Hd-Gehalt zur Befruchtungsrate als für die
Abhängigkeit der Spermatozoonzahl von der Befruchtungs-
rate. Dies wird im vorliegenden Zusammenhang auf Grund von turbidimetrischen Messungen wie-

Hier sei auch der Befund von C h a n g (32) er-
wähnt, daß bei gleicher Spermatozoonzahl für die Befruchtung

weil auch insofern das konzentriertere Sperma erfolgreicher ist.
Im aber mit schlechten Samenqualitäten Befruchtungen zu erzielen und weil es nicht möglich ist, die Zahl der Spermien zu vergrößern, wurde der Versuch gemacht, über die Zugabe von Hd zu einer Konzeption zu gelangen. Tierexperimentell wird dieser Beweis von Rowlands (183) gegeben, der bei Zugabe von Hd-haltiger Samenflüssigkeit zu einer bestimmten Anzahl von Eiern die Befruchtung zu erzielen vermochte. Ch'ang (27, 30) konnte dies bei Mäusen beobachten.

Für den Erfolg Rowlands den günstigen Einfluss der Samenflüssigkeit als natürlichstem Verdünnungsmittel verantwortlich.

Salimann u. Mitarb. (187) halten für möglich, daß ein zu großer Hd-Gehalt das Ei schädigt. Dies wird experimentell von Pincus u. Mitarb. (161, 162) gesichert, der bei Polyspermie eine Schädigung des Eies beobachtete. Filandau u. Mitarb. (17) berichten jedoch von normaler Befruchtung beim Eindringen vieler Spermien in die Eizellen.

Den Versuch, diesen Widerspruch zu erklären machen Pálgaard-Mikkelsen u. Mitarb. (37) und Cowley (105), die auf die Selbstregulation des Hd-Gehaltes im Ejakulat weisen, bei der das Ferment im flüssigen Anteil auf jenes in den Spermatozoen wirkt. Auf diesen speziellen Fall angewandt würde es bedeuten, daß Spermien mit großen intrazellulären Enzymmengen das Ei erreichen, wenn sich im Spermaplasma eine hohe Fermentkonzentration bildet, wodurch die Diffusion behindert wird, und daß dann Zerstörungen am Ei bewirkt werden können.

Eine andere Auffassung von der normalen "Inkommunität" der Hd in Befruchtungsgeschwindigkeit von Eizellen ist von Koller u. Mitarb. (106) angedeutet, die der Meinung sind, daß das Ferment die Nidation begünstigt.

Eichenberger (46) vermutet eine Einwirkung der Hd auf die Frühentwicklung des Eies, wie sie von Landorf (151, 152) näher begründet wurde. Er fand bei 13 Fällen von *Lepidogastrium* eine "Nidation".

Wiederholt "habituelle" Aborte aufsteigend. Die Ursachen von mütterlicher Seite ausgeschlossen werden konnten, 15 Fälle von Oligospermien mit Hypoospermien, 1 Fall von Normospermie mit Hypoospermie und 2 normale Spermiabefunde. Die Erklärung lautet, daß für die Bildung des embryonalen Mesoderms Hyaluronsäure notwendig ist, die aus Azetylglukosamin und Glukuronsäure leichter aufbauen könne als aus kleineren Molekülen. Diese so benötigten Bausteine entstehen durch die Tätigkeit der Hd in der Zervix. Ein Mangel resultiert ein für die Entwicklung des Embryos unfähiges Milieu, das zum Spontanabort führt. Die klinische Erfahrung, daß bei Aborten, die bei Tyler (213) Erwähnung.

Indirekt ist vielleicht auch so der Mißerfolg, in vitro befruchtete Eier über ein bestimmtes Stadium der Entwicklung hinaus zu züchten, eine Beseitigung der Viskosität. Wenn diese Eier jedoch in die Tube eingebracht, dann können nach 2 - 3 Tagen reguläre Teilungen beobachtet werden, wie Pinous u. Mitarb. (161) berichten.

Pommerenke u. Mitarb. (167) konnten im Penetrationsvermögen durch den Schleimpfropf zwischen ungewaschenen und gewaschenen, also Hd-ärmeren Spermatozoen, keinen Unterschied feststellen. Das beweist, daß die Viskosität auf die Viskosität des Zervikalpfropfes hat, wie es auch Kurzrock (104) und Dalgaard-Mikkelsen u. Mitarb. (37) und Pellizari (154) fanden.

Stemmer (198) glaubt die Aufgabe der Hd u.a. auch in der Ermöglichung einer Resorption von Spermawirkstoffen zu sehen, die bei der Frau innersekretorische Stimulationen bewirken sollen.

Zusammenfassend ergibt sich nach Kulonen (101), daß die Spermienkonzentration oder der Hd-Gehalt des Ejakulates allein nicht Zeichen für die Befruchtungskapazität sind. Die Viskosität des Ejakulates ist ein wichtiger Faktor zu betrachten, wie es auch von Chang u. Mitarb.

(118), McClellan (109) und Reckert u. McClellan (110) behaupten, daß das Blut einen Inhibitionsfaktor von Blutagglutination gegen die Hd besitzt, nach McClellan (110) in der Pseudoglobulinfraktion. Dorfmann u. Reckert (111) fanden übrigens, daß der Titer dieses Faktors bei Männern im Reproduktionsalter niedriger ist als bei anderen untersuchten Gruppen.

Nach Rothschild (181) besteht die Möglichkeit der Verhütung einer Konzeption bei Eintritt einer Konzeption, wie sie bei der Verhütung durch Blutagglutination durch die Cervixdehnung eintreten kann. Diese klinische Erfahrung wird auch von anderen Autoren, so z.B. von Leonard u. Mitarb. (109) bestätigt, wenn auch die gleichen Autoren (110) die Konzeption durch die Einführung von Blutserum in die Uterushörner von Ratten nicht verhindern konnten.

Da Hd ein Eiweißkörper ist, ist es möglich, Antikörper zu erzeugen, wie es von Leonard u. Mitarb. (109) auch intraperitoneale Gaben von Hd bei Ratten voraussetzt wurde. In vitro war eine Hemmung der Follikelzelldispersion nicht nachzuweisen, nur bei einer der 5 Ratten konnte im Blut durch den Präzipitationstest ein Antikörper gefunden werden. Diese Ratten waren in der Lage, die Follikelzelldispersion in größeren Verdünnungen zu hemmen, als normale Sera dies tun. Nur in einem Uterusssekret konnte ein Hd-Antikörper die Fermentaktivität hemmen.

Dagegen konnten Megill u. Mitarb. (137) durch Injektion von Spermaflüssigkeit und Sperma menschlicher Herkunft in Ratten Antikörper gegen HS erzeugen und durch Störung der Follikelzelldispersion in vitro nachweisen, jedoch war die Fertilität dieser Ratten nicht vermindert.

Leves (108) betrachtet den Versuch, der von Escuder (31) unternommen wurde, durch Spermaextrakt-Injektionen bei einer Patientin eine zeitweilige biologische Sterilität zu erreichen, als eine Antikörperwirkung gegen die Hd. A. V. Schultze (190), der hierüber aus den neueren amerikanischen Schriften berichtet, führt die sterilisierende Spermaimmunität auf eine Antikörperwirkung zurück, die nicht speziell gegen das Ferment gerichtet ist.

Wiederum J. u. Mitarb. (116) und K a r z e n u. Mitarb. (117) zeigten bei unexplorierter Sterilität eine Erhöhung der H₂O₂-Konzentration gegen Hd zu finden, die von K a r z e n (117) mitgeteilte Tatsache, daß Ehepaare mit erniedrigten diabetischen Partnern häufig steril sind, selbst auf eine Störung der Eireifung im Ovar hindeutet. M o o r e (148) konnte auch beim Alloxan Diabetes keine erniedrigten H₂O₂-Konzentrationen der Leutenho-

rn feststellen. In einer Arbeit von J. u. Mitarb. (116) wurde bei Inseminationen ein Befruchtungsprozentsatz von 24 % erreicht. Nach C h a n g (29) konnte ein toxischer Effekt auf die Spermien nicht ausgeschlossen werden.

Ein anderes Experiment ohne die direkte Wirkung auf die Spermien unternahmen M a r t i n u. Mitarb. (125), die weiblichen Ratten oral und peritoneal geringe Mengen von phosphoriertem Hesperidin zuführten und einen Rückgang der Fruchtbarkeit bei den so behandelten Tieren auf rund 20 % erzielten. Dieser antikonzeptionelle Effekt dauerte 3 Wochen, nach dieser Zeit wurden 80 % der Experimentaltiere wieder trüchtig. Eine andere Serie, bei der die Männchen behandelt wurden, zeigte keinen Unterschied zur Kontrollreihe.

Die beiden letzten Arbeiten zeigen, daß die Hemmung der Hd-Aktion einen deutlichen Konzeptionsverhütenden Effekt zeigt. Dieser ist unter den normalen Verhältnissen allerdings nicht vollständig, woraus zu schließen ist, daß die Hd für das Zustandekommen der Konzeption nicht allein verantwortlich ist, wie das vielfach angenommen wurde, sondern daß sie beim Befruchtungsvorgang nur eine fördernde Wirkung hat.

Von S i e v e (195) wurde phosphoriertes Hesperidin zur Konzeptionsverhütung bei 500 Ehepaaren verwandt. Es wurde eine temporäre Sterilität durch orale Gaben an beide Partner erzielt worden. In keinem Falle ergab sich eine ungewollte Schwangerschaft. Die beabsichtigten Konzeptionen wurden

sch wurde jedoch von Konzeptionen berich-
gesichert niedrigen Spermienkonzentrationsen einge-
so von K. W. S c h u l t z e (193) bei 4 Mil-
pro cem. Von M i c h e l s o n (142) wurden 5 Be-
ngen mit Ejakulaten unter 1 Millionen Spermatozoen pro
davon einmal Zwillinge - und zwei sogar unter 500 000
zoen pro cem mitgeteilt. E s e u e r (8) hat eben-
Konzeptionen unter 1 Million Spermien pro cem gesehen.
Konzeptionen widersprechen der Annahme, daß ohne einen
Hd-Gehalt keine Befruchtungen auftreten können.

Es lag nahe, die Befruchtungstheorie nach L e c l e a n
stärken, und die Befruchtungstheorie nach L e c l e a n
stärken.

Ausgehend von den Ergebnissen R o w l a n d s (184),
daß bei der Zugabe von Hd nur 1/6 der Spermatozoen für die
Befruchtung des Kaninchens ausreichen, und der Erforschung
dieser Art der Sterilität durch K u r z r o k u. Mitarb.
(192), die bei normaler Spermienzahl das Fehlen der Hd ein-
führt, - was aber, wie in der Literatur (193, 194, 195)
einer wohl nicht ausreichenden Methodik zu beruhen scheint, -
versucht E. J. S e e k (196) die Sterilität durch die Zu-
gabe von Hd auch beim Menschen die Sterilität zu bekämpfen.
In einer zusammenfassenden Veröffentlichung stellt der Autor
157 Patientinnen, die er ohne Hd, 158 Patientinnen gegenüber,
die er mit diesem Element behandelte.

Er verwandte zwei Therapiemethoden:

- a.) lokale Applikation und
- b.) Zugabe zum Sperma.

Nach C h a n g (30) sind jedoch beide Methoden
gleichwertig.

K u r z r o k erzielte von der unbehandelten zur be-
handelten Gruppe eine Befruchtungszunahme von 10 %
%. Entgegen der Angabe von W e r t h e s s e n (226)
und D ö d e r l e i n (41), daß dies Ergebnis statistisch
nicht gesichert sei, ergab sich bei der Nachprüfung eine
Wahrscheinlichkeit von $p = 0,001$. Dieses wird von M i e n -
r (197) auch gefunden. S a l l m a n n (185) kann-

bei 12 Patientinnen mit H. erzielt.

H a l b r e c h t (75) benutzte bei 102 Inseminationen, 36 Patientinnen wurden behandelt, bei 66 Patientinnen nicht feststellen. Der Erfolgsgrad liegt bei ihm um 28 %.

V a f e l u. Mitarb. (210) berichten von 25 Patientinnen, die mit Hd behandelt wurden, jedoch trat nur in einem Fall eine Schwangerschaft ein. Bei drei sterilen Ehepaaren eine Schwangerschaft durch Hd-Zugabe zu einem oligospermien Ejakulat erzielen.

S i e g l e r (194) behandelte 48 Patientinnen mit und 37 ähnlich gelagerte Kontrollfälle ohne Hd. In der ersten Gruppe resultierte keine Schwangerschaft, in der zweiten Gruppe 22 Schwangerschaften.

F a r r i s (54), W e t t e r d a l (228), J o e l (88), M o e n c h (146) und B i s h o p (16) konnten keine Erfolge bei der Verwendung von Hd erzielen.

Von C h a n g (28) und W e r t h e s s e n (225) wird der gute Erfolg von K u r z r o c k auf die exakte Bestimmung des Ovulationstermins zurückgeführt. Für diese Auffassung spricht auch der Erfolg bei der Behandlung von H a l b r e c h t (75) erzielte. Zum Vergleich mögen auch die Konzeptionsraten dienen, die von einer deutschen Klinik durch R ö t t g e n (182) berichtet werden: 47 % erfolgreiche Befruchtungen bei 34 Patientinnen.

K l u d e s u. Mitarb. (99) und andere Autoren konnten günstige Konzeptionsresultate nach vaginaler Injektion von lebenden Milchsäurebakterien beobachten und führten dies auf eine direkte oder indirekte Hd-Wirkung zurück. Jedoch konnte von G i l l e r t (63) ein solcher Mechanismus nicht bestätigt werden.

Der Versuch, der von d e R u d d e r (40) unternommen wurde, die verminderte Befruchtungsfähigkeit als eine durch Mangelernährung bedingte Stoffwechselstörung zu erklären, die den kleineren Androspermien gegenüber den Gynospormien eine bessere Penetrationschance in das Ei gibt, konnte bisher experimentell noch nicht gesichert werden.

Aus diesen Ergebnissen kann nun der Gebrauch der Hd zur Bekämpfung der Sterilität, soweit sie durch den sog. nächtlichen Pulsus - verursacht ist, abgeleitet werden. Bei normaler Spermienzahl vergrößernde Wirkung des Fermentes kann schon mit dem großen Erfolg, da der Enzymgehalt des normalen Ejakulates als ausreichend für eine Befruchtung erachtet werden kann, eine Ansicht, die auch von C h a n g (29) vertreten wird.

Es ergeben sich hiernach nur noch folgende Indikationen:

- 1.) Nach K u r z r o k (104): Bei einer Spermienkonzentration unter 50 Millionen pro ccm, da in diesem Bereich durch Erhöhung des Hd-Spiegels im Samen die Befruchtungschance der relativ geringen Spermienzahl anscheinend erhöht werden kann.
- 2.) Nach eigenen Untersuchungen ist die Anwendung des Fermentes günstig bei Spermatozoen, die eine kurze Lebensdauer aufweisen, da diese verlängert werden kann.

Das Vorkommen einer Hypofermentie bei einer normalen Spermienzahl wurde hierbei als nicht gesichert angesehen.

Nach der Angabe der Indikationen scheint es bei bestimmten Fällen von Sterilität möglich, mit Hd therapeutisch einzugreifen. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die klinische Erfahrung in Zukunft diese Erwartungen bestätigt.

Zusammenfassung der Literatur.

Aus der angeführten Literatur, die den weitaus größten Teil der bis Anfang 1953 erschienenen Arbeiten umfaßt, läßt sich zusammenfassend folgendes feststellen:

Die Hd ist ein Ferment, das inkonstant bei den Säugetieren vorkommt. Die Hd-Bildung im Hoden erfolgt an cytotoxisch empfindlicher Stelle, entsteht im Sertolizytoplasten in den Sertolizellen. Im Ejakulat befindet sich das Ferment im zellulären Anteil, in einer für den Bullen und Menschen annähernd bekannten strengen Abhängigkeit von der Spermatozoenkonzentration und differenziert ganz verschieden im Gleichgewicht und mit dem Spermatozoon verbunden. In Ab-

... hat den Anschein, als
... der Bestandteil der Spermatozoen sei
... Ei beschützt sich wahrscheinlich auf ei-
... und Lockerung der Granulazellen, durch
... die Befruchtungsfähigkeit des Eies voll erhal-
... Die restlichen Cumuluszellen und die Corona radiata
... einen seiner Natur nach noch unbekannten Pubal-
... entfernt. Ob die Hd eine Rolle in der frühen Eient-
... spielt, ist noch nicht entschieden.

Festzustehen scheint, daß Mac Clellan und Row-
... die Rolle der Hd in der Befruchtung zu ausschließ-
... aufweist und ihre Wirkung bei der Konzeption über-
... haben. Diese ist aber jedenfalls nur das Ergeb-
... zahlreicher späterer Untersuchungen abzuwarten.

Experimentell konnte durch Hemmung der Enzymaktivität
... eine nicht vollständige antikonzeptionelle Wirkung erzielt
... welche die Hilfsstellung der Hd bei der Befruchtung
... therapeutische Erfolge bei der Behandlung der
... menschlicher Sterilität sind noch zu untersuchen, als daß
... daraus endgültige Schlüsse gezogen werden könnten.

Nachdem aus der Literatur die Rolle der Hyaluronidase (Hd) bei der Befruchtung klargestellt ist, müssen nun die Grundlagen erarbeitet werden, um den therapeutischen Gebrauch von Hd bei menschlicher Sterilität in seiner Indikation und deren Ausmaß festzulegen.

Hierzu war es wichtig, den Hd-Gehalt von tierischem und menschlichem Sperma in seiner Abhängigkeit von anderen Spermeneigenschaften und die Wirkung von hinzugefügter Hd auf die Spermatozoen zu untersuchen.

Untersuchungen am Bullensperma.

Als Modellversuch für spätere menschliche Untersuchungen wurde Bullensamen gewählt, weil er leicht erhältlich ist, Befruchtungen in großer Zahl erfolgen und die Beurteilung der Samenbeurteilung durch die Veterinärmedizin sehr weit voran getrieben worden ist.

a.) Material.

In die Untersuchungen wurden im einzelnen Spermata folgender Bullen einbezogen:

- 1.) Aus den Bullenställen der Besamungsstation Mariensee (Krs. Neustadt a. Rbg.) und des Max-Planck-Institutes für Tierzucht Mariensee (Krs. Neustadt a. Rbg.):

Günther	Schwarzbunter	11	Jahre	- 4	Ejakulate
	Niederungsbulle				
Assessor	" "	5 1/2	"	- 4	"
Antec	" "	2 1/2	"	- 1	"
Martin	" "	3 1/2	"	- 1	"
Karl-H. ins	Angler-Bulle	2 1/2	"	- 15	
Jim	Guernsey-Bulle	1	Jahr	- 2	"
Meteor	ohne Angaben			1	"

1. Teil: ... des Tierärztlichen Institutes der
... Vereinigungsgesellschaft Göttingen

Ausgangspunkt	Schwarzbunter	4 1/2 Jahre	- 5 Ejakulate
	Niederungsbulle		
Ergebnis	"	2 1/2	" - 4 "
Gesamt			39 Ejakulate.

Der ... aus Meriensee (1.) war im allgemeinen 8 Stunden
... er zur Beurteilung kam, jener aus Göttingen (2.)
... bereits nach 1 - 2 Stunden untersucht worden.

Das Sperma wurde stets durch eine künstliche Scheide
...

a.) Die Technik des Spermiogrammes.

Zuerst wurden die folgenden Daten festgelegt:

1. Zeit und Uhrzeit der Samenabgewinnung

2. Zeit und Uhrzeit der Samenuntersuchung,

3. Name der letzten Gewinnung,

4. Volumen des Ejakulates, für 1. und 2. Sprung getrennt.

Bei der Anfertigung der Spermiogramme für Bullen wurde
im allgemeinen nach den Angaben von G ö t z e (65) verfahren.

1.) Grobsinnliche Prüfung.

a) Dichte

b) Farbe

c) Viskosität

d) Geruch

e) Schleimgehalt

f) Beirührungen, Verschmutzungen

g) pH, grob orientierend mit dem pH-Universalindikator
Merck.

2.) Spermienzählung.

Hierzu diente eine Zählkammer nach Thoma, eine
Zählpipette für Erythrocyten und als Zählflüssigkeit
2 Teile KOH-Lösung mit drei Tropfen 1 %iger Methylenblau-
Lösung pro 10 ccm. Diese Mischung mußte stets neu herge-

...e erwies sich als vorteilhaft, da sie ... anhaftenden Schleim löst. In der Pipette ... Sperma im Verhältnis 1 : 100 mit der Zählflüssigkeit ... haltig gemischt und dann wurden mikroskopisch ... Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Die gefundene Zahl, mit 5 000 multipliziert, ergab die Zahl der Spermatozoen im cmm.

Überprüfungen der Fehlerbreite der Spermatozoenzählung in Form von Stichproben ergaben ca. 18 % bei geringerer Spermiedichte bis ca. 10 % bei stark konzentrierten Spermata. Somit liegt die Fehlerbreite innerhalb der von anderen Autoren errechneten und experimentell gesicherten Fehlergrenzen von 16 - 10 % bei W a g a t h u. Mitarb. (122) und 20 % bei W e r t h e s s e n u. Mitarb. (227).

4. Die Beurteilung der Beweglichkeit.

Ein Spermatröpfchen wurde auf einem Objektträger ohne Deckglas bei mittlerer Vergrößerung auf die Massenbewegung hin untersucht. Hierbei konnte man die fischzugartigen Bewegungen, die für frisches und aktives Bullensperma charakteristisch sind, beobachten. Unter einem Deckgläschen wurden dann bei Zimmertemperatur die Prozentsätze von "Vorwärtsbewegung" der Spermien

"Ortsbewegung" der Spermien und

"anabiotische" Spermien, - die toten und in Kältestarre befindlichen werden hierbei unter dem Oberbegriff "Anabiose" zusammengefaßt, - geschätzt.

Anschließend wurde der Objektträger auf 35-40° C erwärmt und nochmals eine Beurteilung nach obigem Schema vorgenommen. Allerdings sind die jetzt noch bewegungsunfähigen Spermien der Rubrik "tote Spermien" zuzuordnen.

Gleichzeitig wurde auf das Vorkommen von Agglutination geachtet.

4.1 Resistenzbestimmung der Spermien.

Die vereinfachte Methode der Bestimmung der Resistenz nach G ö t z e (65) erwies sich für Reinenuntersuchungen am brauchbarsten. 0,01 ccm Sperma wurden mit 100 ccm 1 %iger NaCl-Lösung (1:10 000) versetzt und nach je 5 min ... Vorwärtsbewegung untersucht. Die Zeitdauer dieser Vor-

ist ein Maß für die Lebensdauer der Spermien.

Bei größerer Verdünnung der Samenflüssigkeit ist die Lebensdauer kleiner. Diese Methode ist nicht sehr genau.

Die Lebensdauer der Spermien kann auch durch die Bewegung bestimmt werden.

Die Lebensdauer der Spermien kann auch durch die Bewegung bestimmt werden.

Auf einen sauberen Objektträger wurde eine Tropfenflüssigkeit mit einem Tropfen 5 %iger wässriger Eosinlösung gegeben und anschließend dünn ausgestrichen und unter einem Deckglas binnen einer Minute beurteilt. Die toten Spermien sind dann rot gefärbt, jene, die noch lebend sind, haben blaue Kerne und sind hell auf dunkelbraunem Grund. Die Lebensdauer wurde geschätzt.

Gleichzeitig wurde die Modifikation dieser Methode nach B l o m (18) angewandt: Ein Tropfen Samenflüssigkeit wurde mit einem Tropfen 5 %iger wässriger Eosinlösung auf einem Objektträger gemischt und dann mit einem Tropfen einer 10 %igen wässrigen Nigrosin-Lösung versetzt, dünn ausgestrichen, über einer Flamme getrocknet und beurteilt. Die lebenden Zellen nehmen kein Eosin an und sind hell auf dunklem Grund, die toten Spermien sind rot auf dunkelbraunem Grund.

2) Untersuchung der Spermienlebensdauer.

Sperma wurde 1 : 4 mit dem Glukose-Phosphat-Verdüner für Rinder nach M i l l i w a n o w (145) verdünnt und in einem kleinen Gläschen unter Luftabschluß durch flüssiges Paraffin bei Zimmertemperatur gehalten.

In Abständen von 6 - 10 Stunden wurden mit einer feinen Nadel kleine Proben entnommen und auf Beweglichkeit untersucht.

Die Lebensdauer der Spermien ergibt das Maß für die Lebensdauer der Spermien.

Verdünner für Rindvieh nach A i -
 hat folgende Zusammensetzung:

Alkohol	2,85 g
Salz	1,75 g
Wasser	0,07 g
...	0,03 g
...	100,00 g

Die Färbung ... nach K a u f m a n (97) verwendet, da sie sehr
einfach ist und gute Zellbilder gibt.

- 2 min in 10 %igem Formalin fixieren,
- 1 min in Hämatoxylin färben,
- 1 min in lauwarmen Wasser abspülen.

Es wurden von jedem Ejakulat 200 Spermien mit der Osmi-
mersion nach folgendem Schema ausdifferenziert und in
Prozent angegeben:

- *) Normale Spermien.
- β) Spermien mit größeren Köpfen als es der Norm ent-
spricht.
- γ) Spermien mit kleineren Köpfen als es der Norm ent-
spricht.
- δ) Pathologische Spermienformen aller Art.
- ε) Geigenschlüsselartig verkrümmte Schwanzgeißel
Ausdruck osmotischer Störungen.
- ζ) Unreife Formen.

c.) Die Methodik der Hyaluronidase-Gehaltsbestimmung.

Über die verschiedenen Fermentmessungsmethoden in
und Gewebe geben zusammenfassende Auskunft die Arbeiten von
P o l l a k (166), G i b b i a n (59), M e y e r (138, 140),
E v a n s u. Mitarb. (52), R i i s f e l d t (176), J o e l
(88) und B o l t r a f f i o (21). Da für diese Untersu-
chungen eine einfache und für Reihenversuche geeignete
Methode notwendig war, wurde zur Messung der Fermentaktivität
der Füllkörper mit minimalen Abweichungen der Kurzzeittest
verwandt, dessen theoretische

Grundlagen von Lundquist (138), Wilson u. Mitarb. (143), Swyer u. Mitarb. (209), Hadidian (50, 61), Dorfman u. Mitarb. (193) und Hultin (84) ausgearbeitet wurden. Sein Aufbau beruht auf der Tatsache, daß die Wirkung der Hd auf Salzsäure (HS) innerhalb gewisser Grenzen im Rahmen einer katalytischen Reaktion abläuft und daß sich die Viskositätskonzentrationslösung proportional der Konzentration an HS verhält.

Zu diesen Test sind erforderlich:

1.) Geräte:

- a) Ein Thermostat, der in der Lage ist, die Temperatur bei $37^{\circ}\text{C} \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ zu halten. Es wurde 37°C gewählt, da diese Temperatur den physiologischen Bedingungen im Körper entspricht und die Reaktion sich in genügender Schnelligkeit vollzieht.

Von anderen Autoren wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Temperaturen für die viskosimetrische Hd-Messungen bevorzugt.

Tabelle 1.

Temperatur	
$38,0^{\circ}\text{C}$	Werthessen u. Mitarb. (227)
$37,5^{\circ}\text{C}$	Shurber u. Mitarb. (193)
$37,0^{\circ}\text{C}$	Meyer (138), Wilson u. Mitarb. (143) Dalgaard-Mikkelsen u. Mitarb. (73) Riisfeldt (176)
$34,0^{\circ}\text{C}$	Swyer u. Mitarb. (209), Hale (75)
$32,0^{\circ}\text{C}$	Hadidian u. Mitarb. (70)
$31,0^{\circ}\text{C}$	Vandelli (235, 236)
$30,0^{\circ}\text{C}$	Schering (235), Michelson u. Mitarb. (143), Eichenberger (47), Eizner (177)
$28,0^{\circ}\text{C}$	Ciulla u. Mitarb. (34)
$20,0^{\circ}\text{C}$	Joel u. Mitarb. (89), Pollak (165), Eichenberger (46)
Kammer- temperatur	Wehrle u. Mitarb. (224)

Im folgenden Versuchen verwendete Viskosimeter hatte eine Fließzeit für Aqua dest. von 12,6 sec. und für Vergleichslösungen ca. 14,0 sec.

Der Nachteil einer solchen Viskosimeterpipette liegt in der mangelnden Beheizung, was sich vor allem auf die ersten Meßpunkte auswirkt. Dieses kann jedoch teilweise verhindert werden, indem man die Pipette vorher erwärmt. Bei einer nicht angewärmten Pipette wurde erst nach 8 - 9 min eine Konstanz der Werte erreicht.

Dieser Nachteil aber scheint für Reihenuntersuchungen gering gegenüber dem Vorteil der leichteren Handhabung und Einfachheit, die diese Pipette im Gegensatz zum Oswald-Viskosimeter auszeichnet.

8) Die Versuchslösung wird während des Versuches in den Meßraum während des Versuches.

§) Zwei Stoppuhren, wovon eine zur Messung der Versuchsdauer, die andere zur Messung der Fließzeit durch das Viskosimeter dient.

§) Reagenzgläser.

2.) Chemikalien.

a) 10 g. Natriumacetat-Lösung.

§) Na-Azetat-Puffer von pH 4,5.

Der während der geschilderten Versuche gebrauchte Puffer hatte die Zusammensetzung

87 ccm n-NaOH

13 ccm CH_3COOH (konz.)

und hatte ein elektrisch gemessenes pH von 4,47.

Das pH von 4,5 wurde gewählt, da es von G i b b i a n (59) als Wirkungsoptimum für Testis-Hd angegeben wird. Von anderen Autoren wurden für viskosimetrische Untersuchungen die in Tabelle 2 aufgeführten pH-Werte und Puffer verwandt.

Tab. 11

	Substrat	Autor
1	Hyaluronat	Schering (235)
2	Hyaluronat	Shurter u. Mitarb. (193)
3	Hyaluronat	Eichenberger (46)
4	Hyaluronat	Michelson u. Mitarb. (143)
5	Hyaluronat	Mitarb. (13)
6	Hyaluronat	Joel u. Mitarb. (89)
7	Azetatpuffer	Meyer (138)
8	Azetatpuffer	Rizatti (177)
9	Citrat-Phosphat	Swyer u. Mitarb. (209)
10	Citrat-Phosphat	Dalgaard-Mikkelsen u. Mitarb. (36)
11	Citrat-Phosphat	Riisfeldt (176)
12	Phosphat	Hadidien u. Mitarb. (70)
13	Phosphat	Hale (76)
14	Phosphat	Eichenberger (47)
15	Citrat-Phosphat	Wilson u. Mitarb. (231)

nach Perloff u. Mitarb. (158) darf ein pH von 4.2 für Casein-HI nicht unterschritten werden, da diese sonst inaktiviert wird.

- 4) Auf die Herstellung der HS wurde verzichtet, da bereits reinere und einheitlichere Präparate bezogen werden konnten. Wegen der Extraktion von HS aus verschiedensten Quellen geben Hahn (73, 74), Lundquist (118), Wallenfels (222), Boltraffio (21) und Gibian (59) Auskunft. Als Substrat wurde HS aus Nabelschnur der Fa. Schering benützt und es kamen folgende Einzelherstellungen zur Verwendung:

Hyaluronsäure N 6
Hyaluronsäure N 11
K-Hyaluronat N 17/20 D.

Die Herstellung der HS-Lösung:

Die HS-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

Die HS-Lösung wurde hergestellt aus 10 Vol-% Na-Azetat-Puffer

Die HS hergestellt und mit 10 Vol-% Na-Azetat-Puffer versetzt und nach gutem Schütteln filtriert. Am nachfolgenden Tag wurde die HS-Lösung in den angegebenen Konzentrationen der HS, da sie etwa die 2 - 3fache Viskosität gegenüber Wasser besitzen, was bei der Viskosimeterpipette C eine Auslaufzeit von ca. 30 sec. ausmachte.

§) Die Puffer-Salz-Lösung entsprach im ganzen der HS-Lösung, nur ohne HS, also 6 %ige NaCl-Lösung und 10 Vol-% Na-Azetat-Puffer.

§) Bei der Herstellung der Fermentlösung aus Bullensamen wurde nach dem Vorschlag von S w y e r (205) verfahren.

0,1 cem Samen wurde in 10,0 cem Aqua dest. gelöst, diese Mischung im Kühlschrank bei 0 - 1°C für 24 Stunden aufbewahrt und dann vor der Verwendung filtriert.

Das 24-stündige Stehenlassen bei 0°C in wässriger Suspension erwies sich bei den Versuchen von S w y e r (205) als ausreichend, die Hd maximal zu extrahieren. Umständlichere Methoden führten kaum zu einem besseren Ergebnis.

Ebenso wurde auf einen Toluolzusatz verzichtet, wie ihn P e r l m a n u. Mitarb. (155) zur angeblich besseren Extraktion vorschlagen, da J o h n s t o n u. Mitarb. (92) nachweisen konnten, daß keine bessere Extraktion und nach 24 Stunden, selbst bei 37°C, durch das Bakterienwachstum keine Veränderung im Hd-Gehalt eintritt.

Die Verdünnung sollte immer so gewählt werden, daß die Halbwertszeit 8 - 15 min beträgt.

Eine mikroskopische Auswertung des gefärbten Filtrerrückstandes ergab, daß eine grobe Zerstörung der Spermien nicht stattgefunden hatte, die Köpfe waren aufgeteilt, besonders die Kopfkappe, das Mittelstück

... ebenfalls aufgehellt, die Schwärze war
... in 20 % waren sog. Geigen-
... als Ausdruck einer osmotischen Stö-
rung nachweisbar. In keinem Falle konnten in unge-
färbten Präparat lebende Sporenen nachgewiesen werden.

Die Berechnung des Viskositätsmittelwertes.

Für jeden Versuch zunächst die Fließwerte
 t_S = Fließzeit der Substratlösung und
 t_V = Fließzeit der Vergleichslösung bestimmt werden.
Die Viskosität der Fermentlösung (Mullensamen wurde
zwischen 1:100 - 1:800 verdünnt) konnte in unseren
Versuchen gleich der Viskosität von Aqua dest. an-
gesetzt werden, ohne daß dies einen großen Fehler aus-
gemacht hätte.

So wurde in einem Reagenzglas 0,5 ccm der HS-
Lösung und 0,1 ccm Aqua dest. im Thermostaten 5 min
temperiert und die Auslaufzeit dieser Substratlösung
 t_S , d.h. jene Zeit, die die Lösung gebraucht, um bei-
de Strichmarken der Kapillare zu passieren, bestimmt.
Gleicherweise wurde die Auslaufzeit der Vergleichs-
lösung t_V bestimmt. Die Vergleichslösung bestand aus
0,5 ccm Puffer-Salz-Lösung und 0,1 ccm Aqua dest.
Jede Bestimmung muß natürlich so oft wiederholt wer-
den, bis keine größeren Schwankungen als $\pm 0,1$ sec
eintreten, d.h. eine Konstanz der Werte erreicht wird.

Der Mittelwert der Viskosität wird aus den Durch-
schnittswerten von t_S und t_V wie folgt errechnet:

$$\text{Fließzeit des Mittelwertes } t_M = \frac{t_S + t_V}{2} .$$

.) Beschreibung eines Versuches zur H₂O₂-Gehalts-Bestimmung.

Ein Reagenzglas mit 0,5 ccm HS-Lösung und die
filtrierte Fermentlösung wurden getrennt einige Mi-
nuten im Wasserbad des Thermostaten auf die Reak-
tionstemperatur gebracht und dann wurde 0,1 ccm der
Fermentlösung in das Glas mit der HS-Lösung überge-
geben und die gerade beobachtete Leuchtintensität

... wurde Viskositätskapillare eingestellt und mit der Wasserstrahlpumpe die Lösung über die obere Strichmarke geleitet, dann ließ man die Lösung die Kapillare durch die Pipette zurücklaufen.

Mit der zweiten Stoppuhr wurde nun laufend der Abfall der Viskosität gemessen, wie er durch die Aktivität der Hd auf die HS-Lösung zustande kam und zwar wurde jeweils die Fließzeit t_F zwischen beiden Marken festgestellt. Mit der ersten Stoppuhr wurde gleichzeitig beim Passieren der oberen Strichmarke die Zeit festgelegt, die seit Versuchsbeginn verstrichen war. Dies wurde so lange durchgeführt bis t_F den Mittelwert t_M unterschritten hatte.

6.) Errechnung der Halbwertszeit.

Zu der Zeit, die seit Versuchsbeginn bis zum Beginn jeder Fließzeitbestimmung t_F verlaufen war, wurde nun noch die jeweils ermittelte halbe Fließzeit $t_F/2$ hinzugerechnet und dann auf Millimeterpapier aufgetragen: Auf der Abszisse stand die Zeit, die seit Versuchsbeginn verlaufen war + $t_F/2$ (Versuchsdauer) in Minuten, auf der Ordinate die Fließzeit t_F in Sekunden.

Der Schnittpunkt der erhaltenen Kurve mit dem Mittelwert der Viskosität t_M ergab auf der Abszisse die Halbwertszeit in Minuten.

Eine derartige graphische Darstellung eines Versuches für mehrere Verdünnungen zeigt die Abb. 3.

7.) Festsetzung einer Einheit.

Nicht um die Vielzahl der Hd-Einheiten um eine neue zu vermehren, sondern um die verschiedenen Verdünnungen miteinander ohne Umrechnung in ihren Fermentgehalt vergleichen zu können, wurde die VE (Viskositäts-Einheit) festgesetzt.

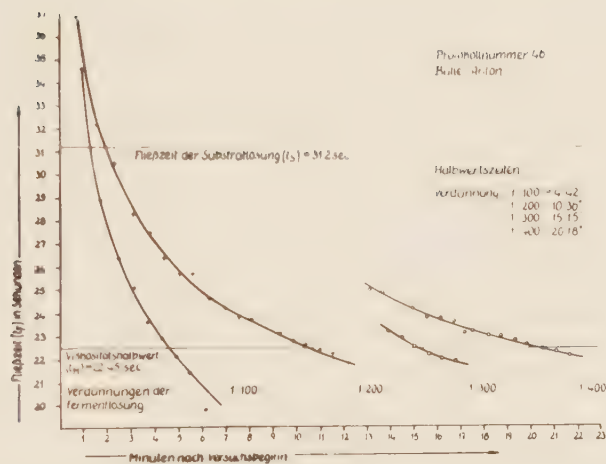


Abb. 3. Graphische Darstellung einer viskosimetrischen Hd-Messung eines Bullene

Eine Viskositäts-Einheit pro cem ist dann in einer Fermentlösung enthalten, wenn 0,1 cem dieser Lösung zu 0,5 cem oben beschriebener HS-Lösung gesetzt bei 37°C und einem pH 4,5 eines Na-Azetat-Puffers die Auslaufzeit dieser Reaktionslösung in 10 min auf den Mittelwert der Viskosität reduziert.

An dem Beispiel der Abb. 3 ergibt sich aus den Halbwertszeiten Verdünnungen folgender Hd-Fermentgehalte:

Verdünnung 1:100 , Halbwertszeit 4,72 min 190 VE/cem
Verdünnung 1:200 , Halbwertszeit 10,36 min 190 VE/cem
Verdünnung 1:300 , Halbwertszeit 15,15 min 190 VE/cem
Verdünnung 1:400 , Halbwertszeit 20,18 min 190 VE/cem
Im Durchschnitt 200 VE/cem (± 5,47 VE/cem)

Rechnungsbeispiel für die Verdünnung 1:100

Halbwertszeit = 4,72 min
100 = 101
190 VE/cem

... durch Variationen.
... skositätseinheiten der ver-
... ist nicht möglich, da sich durch
... der Substratkonzentrationen und
...
... Temperatur eine vielfache Beeinflussung des Fer-
ments ergibt.

Die hier beschriebene Methode wurde in der Ver-
suchsreihe auf ihren Meßfehler hin untersucht und aus
den gesamten Untersuchungen ergab sich als arithmeti-
...
wert der einzelnen Versuche eine Fehlerbreite von
 $\pm 2,99 \%$.

Der Einfluß des Verdünnungsgrades wurde zu der
ermittelten Fermenthöhe des Einzelversuches in Abhän-
gigkeit gemacht, es konnte jedoch keine Abhängigkeit
abgelesen werden. Wenn eine solche vorhanden sein
liegt sie bestimmt unter der ermittelten Fehlerbreite.

Es wurde ferner gefunden, daß es ohne Einfluß auf
die extrahierte Fermentmenge ist, ob die Verdünnung
1:100 für den Versuch später weiter verdünnt wurde oder
ob die Extraktion von vornherein in höheren Suspensions-
graden angesetzt wurde.

Somit ist die beschriebene Methode brauchbar, wa-
einerseits ihre Zuverlässigkeit, andererseits ihre Ver-
wendung bei Reihenuntersuchungen betrifft.

a.) Ergebnisse der Untersuchung.

Die Ergebnisse werden der besseren Übersicht we-
gen in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

	Art der Untersuchung	Anzahl der Untersuchungswerte	Durchschnitt	Schwankungsbereich	Angaben aus der Literatur
1	Feststellung der letzten Samen-gew.	30	vor 5.2 Tagen	vor 2 - 23 Tagen	
2	Untersuchung in Std. nach der Ejakulation	30	19.3 Stunden	1.5 - 84 Stunden	
3	Ejakulatvolumen 1. Sprung: 2. Sprung:	31 12	4.88 ccm 5.55 ccm	2.0 - 11 ccm 3.5 - 70 ccm	Götze (65) 4 - 5 ccm Johnston u.a. (95) 5.2 ccm Stone u.a. (201) 4.33 ccm
4	pH	39	5.7	3.0 - 7.5 ccm	Götze (65) 6.0 - 7.4
5	Spermienzahl pro cmm	39	1.0127 Millionen/cmm	0.2725 - 1.665 Millionen/cmm	Götze (65) 0.8 - 1.2 Johnston u.a. (95) 1.382 Shasny (199) 0.8 Stone (201) 1.386 Mik/cmm
6	VE ccm Hyaluronidase	39	44.7 VE ccm	6.3 - 104.2 VE ccm	
7	Lebensdauer in Stunden	37	68 Stunden	38 - 101 Stunden	Götze (65) 24 - 504 Std Stone u.a. (201) 197 Std
8	Resistenz gegen NaCl in Min.	36	47 Minuten	10 - 130 Minuten	Götze (65) 30 Minuten
9	Aktives Sperma in % bei 40°C	39	82 %	0 ¹⁾ - 100 %	Stone u.a. (201) 67 %
10	Morawski'sche Probe in %	24	18.6 % tote Spermien Fehlerbreite $\pm 100\%$ für die Einzelbestimmung		
11	Blom'sche Probe in %	36	18.6 % tote Spermien Fehlerbreite $\pm 90\%$ für die Einzelbestimmung		
12	Abnorme Spermien in %	39	10 %	9.5 - 23.5 %	Götze (65) 5 - 20 %

*) Bei einem Spermiid war die Untersuchung erst nach 24 Stunden möglich

Zu diesen Ergebnissen müssen noch die folgenden ergänzende Bemerkungen gemacht werden:

zu 1. Die relativ kurzen Intervalle zwischen den einzelnen Samengewinnungen erklären sich aus der Tatsache, daß die Bullen in der Hauptinsaminationszeit untersucht wurden.

zu 2. Da der größere Teil der Ejakulate längere Zeit (6 - 8 Stunden) mit der Bahn verschickt werden mußte und im Rahmen dieser Untersuchungen im besonderen nur die Aktivität des Ejakulates im Vordergrund stand, wurde gegen Ende der Reihe auf frische

zu 9-11. Neben der Abschätzung der Verteilung der
wurde versucht, diese durch zwei Gruppen
abgegrenzten Zonen schärfen, die demnachst
namentlich über in, doch wird der in der ersten Reihe
breiten bei diesen Verfahren zu groß, als daß der
zugewiesen werden könnte.

Hierbei erwies sich das B 1 0 n ' s s e s Probe

zu 12. Bei (150) oder der Austrich nicht zu betrachten war.
Der zwar noch im Bereich der Durchschnittswerte

liegende Prozentsatz von abnormen Spermien ist re-
lativ hoch, erklärt sich aber durch die strenge Be-
urteilung der Differentialzahlen, n.B. unter Ein-
rechnung der kleinen und großen Spermienköpfe.

13.) Im Rahmen der Untersuchungen interessierte in besonderen
die Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von anderen Sameneigen-
schaften.

Am bekanntesten ist aus der Literatur die Bezie-
hung zur Spermienkonzentration.

Es wurde hierfür die doppelt logarithmische Dar-
stellung gewählt, wie sie von W e r t h e i m
Litarr. (227) zum ersten Male angegeben worden ist,
weil aus der Auftragung der ursprünglichen Beobach-
tungswerte nicht unbedingt entnommen werden konnte, ob
dieses Verhältnis eine Linearität oder Kurve zu Grun-
de lag und außerdem der Meffertler relativ wiedergegeben
wird.

Es zeigt sich nun, daß die Korrelation beider Ver-
te stark ist, der Bravais-Pearson'sche Korrelations-
koeffizient beträgt

Da von H o s e m a n n (71) für 37 Freiheits-
grade ein Zufallshöchstwert für $r = 0,467$ angegeben
wird, so kann mit Sicherheit das Vorhandensein einer
Korrelation angenommen werden.

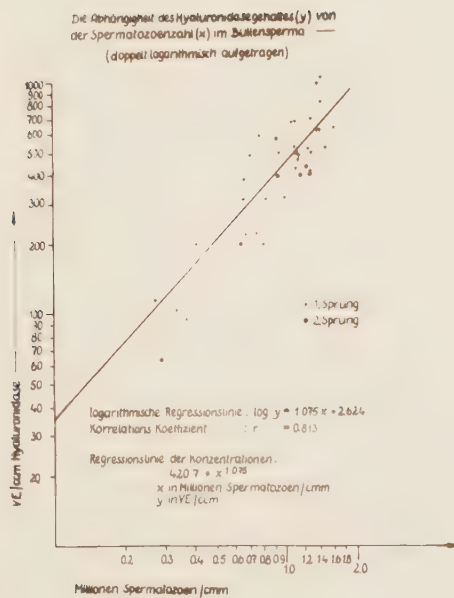
14.) Der mathematische Trend der Beziehung ist also

Als Rechnergeradenlinie der Konzentrationen erstellt
somit

$$y = 420,7 \cdot x^{1,075}$$

wenn y in VE/cm und

gemessen wird (Abb.4).



Es zeigt sich also, daß das für Ferment-Abhängigkeit vorliegt, d.h. der Hd-Gehalt der Bullenspermien ist nahezu proportional seinem Gehalt an Spermatozoen pro cem im Bereich zwischen 0,25% - 1,5 Mikrocen Spermatozoen pro cem.

15.) Aus obiger Formel kann nun aber nicht geschlossen werden, daß die Regressionslinie bei $x = 0$ auch durch $y = 0$ läuft, da diese Voraussetzung bei der Transformation in die doppelt logarithmische Abhängigkeit gemacht wird.

Andere Abhängigkeiten zwischen dem Hd-Gehalt und z.B. der NaCl-Resistenz, der Lebensdauer, dem Prozentsatz der abnormen Formen und dem Volumen wurden zwar geprüft, jedoch wurden die Größen nicht errechnet, da wegen der zu erwartenden geringen Korrelationen nicht genügend Einzelwerte vorhanden waren.

Einzelne Bullen konnten nicht auf Abweichungen gegenüber der oben angegebenen Regressionslinie geprüft werden, da durch die zahlenmäßig geringen Werte von den einzelnen Bullen eine statistische Sicherung nicht zu erwarten gewesen wäre.

Ein Unterschied im Fermentgehalt zwischen dem 1. und 2. Sprung in ihrer Abhängigkeit zur Spermienzahl besteht, wie die Verteilung der einzelnen Ejakulate in der Gesamtkurve zeigt, augenscheinlich nicht. Da L - g a a r d - M i k k e l s e n (35) konnte auch eine solche unterschiedliche Abhängigkeit zwischen fertilen und sterilen Bullen nicht feststellen.

Eine Auswertung der Fertilitätszahlen in Abhängigkeit zum Hd-Gehalt konnte nicht vorgenommen werden, da jeweils nur eine kleine Zahl von Rindern besamt wurde und sich hierbei die Streuung der Einzelwerte zu stark ausgewirkt hätte.

Nach der Verlegung der Plättchen

die Zellen

kommen, wie sie schon bei der Zählung verwendet wurden.

Für die Spermienzählung wurde das unten angegebene menschliche Spermium eine Art Vorkontrollzählpipette (Verdünnung 1:10) bei gleicher Genauigkeit und Zählgenauigkeit, benutzt.

Ausgezählt wurden jeweils 100 kleine Quadrate. Diese Zahl mit 250 000 multipliziert, um die Zahl der Spermatozoen pro ml zu erhalten.

Die Fehlerbreite dürfte hier um einiges geringer sein als bei der Zählung der Bullenspermatozoen, weil die doppelte Anzahl Zellen, auch die verschiedenen Verdünnungsverhältnisse, im Mittel rund die 1 1/2 fache Zellzahl pro Einzelfeld ausgezählt wurde.

- 3.) Die Beweglichkeit wurde in gleicher Weise wie beim Bullensperma geprüft, nur ist durch die geringere Dichte des menschlichen Spermas eine Massenbewegung unbekannt und durch den Fortfall des Transportes in unterkühlten Gefäßen gab es auch keine Kälteanabiose.
- 4.) Die Resistenzbestimmung wurde der geringeren Konzentration des menschlichen Spermas wegen mit 1 %iger NaCl nur in der Verdünnung 1:100 vorgenommen.
- 5.) Nachdem sich im Verlauf der vorigen Versuchsreihe die Unzulänglichkeit der Unterscheidsfärbung von lebenden und toten Spermien herausgestellt hatte, wurde für diese Versuchsreihe die inzwischen bekannt gewordene Modifikation nach T o r u n o - D e l m a n (212) angewandt. Sie wurde folgend durchgeführt:

Ein Tropfen Samen wurde mit zwei Tropfen 5 %iger wässriger Eosinlösung gemischt, einige Sekunden gewartet, dann wurde diese Mischung mit vier Tropfen 10 %iger wässriger Nigrosinlösung vermischt, ausgestrichen und binnen 24 Stunden geprüft.

Die Differenzierung geschah in der gleichen Weise wie bei der B l o m ' schen Färbung (18).

Bei der Auszählung von 100 Spermien nach dieser Methode gefärbt, ergab sich eine Fehlerbreite von

... Methode an sich zuverlässig
... Ergebnissen berichtet.

... wurde die Untersuchung der
... die in der Veterinärmedizin weit ver-
... ist und als äußerst wichtig angesehen wird,
... bisher nur selten ausgeführt. Allein J o e l u.
Mitarb. (88, 91) haben eine Untersuchungsmethode, die
der von uns benutzten sehr ähnlich ist,

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde versucht,
... und so wurde die Untersuchung der Lebensdauer mensch-
licher Spermatozoen im wesentlichen der der Bullen-
spermatozoen angeglichen. Es sei dahingestellt, ob
die angegebene Lebensdauer der im weiblichen Genital-
trakt entspricht, auf jeden Fall ist sie ein Anhalts-
punkt für die Widerstandsfähigkeit der Spermien.

B a k e r (7) hat für menschliches Sperma ei-
ne Verdünnungsflüssigkeit empfohlen, die sich nach
den Untersuchungen von J o e l (88) als die gün-
stigste herausgestellt hat. Sie weist im Ganzen ge-
sehen die gleichen Bestandteile auf, wie der Glukose-
Phosphat-Verdüner für Rinder nach M i l i w a n o w
(145):

Glukose	50,0 g
Na_2HPO_4	6,0 g
NaCl	2,0 g
KH_2PO_4	0,1 g
Aqua dest.	1 000,0 ccm

Mit dieser Lösung wurde 0,1 ccm menschliches
Sperma im Verhältnis 1:4 verdünnt und in kleinen Gläs-
chen unter flüssigem Paraffin lufttrockengeslossen auf-
bewahrt und laufend auf seine Beweglichkeit als Maß
für die Lebensdauer kontrolliert.

- 7.) Die morphologische Untersuchung des Spermas geschah
ebenfalls in der Färbung nach K a u f m a n (97)
und der morphologischen Klassifizierung, wie sie be-
reits für Bullensamen beschrieben wurden.

c.) Infolge des wesentlich geringeren Gehaltes des menschlichen Sperma an Ei mußte die Ei-Untersuchungsmethode etwas modifiziert werden.

Die Apparatur, die Temperatur, das pH, die Substratlösung und ihre Zubereitung wurden beibehalten. Nur die zugegebene Samenmenge wurde variiert. Das Sperma wurde 1:1 mit Aqua dest. verdünnt, damit die visköse Fermentlösung den Viskositätsabfall der Substratlösung nicht verringerte. Danach wurde filtriert. Da aber andererseits die Versuchszeit durch die Verdünnung nicht zu verlängern, wurde die zugegebene Fermentlösungsmenge auf 0,2 ccm erhöht. Bei diesen Versuchen konnte die Viskosität der Fermentlösung, wie Kontrollen zeigten, nicht gleich der Viskosität von Aqua dest. gesetzt werden.

Zur Feststellung der Viskosität der Vergleichslösung wurde 0,5 ccm der Puffer-Salz-Lösung mit 0,2 ccm Fermentlösung versetzt und, wie schon beschrieben, gemessen.

Der Substratwert wurde durch rückwärtige Interpolation der Reaktionskurven von mindestens zwei Versuchen errechnet.

Für jede Bestimmung wurden wenigstens drei Reaktionslösungen angesetzt und gemessen. daraus der Mittelwert der Halbwertszeit bestimmt und in V_0 / ccm umgerechnet, wie schon beschrieben wurde, um damit Werte für den direkten Vergleich zu erhalten.

Die Darstellung eines derartigen Versuchs zeigt Abb. 5.

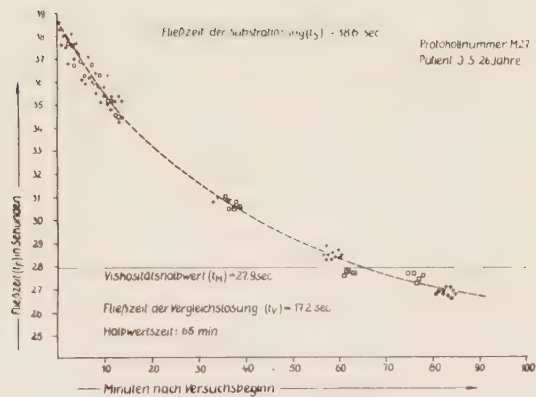


Abb. 5. Graphische Darstellung einer Viskositätsmessung eines rheologischen Präparates.

d.) Ergebnisse der Untersuchung.

Eine Zusammenfassung, zugleich mit den durchschnittlichen Ergebnissen anderer Autoren, sei in tabellarischer Übersicht gegeben (Tabelle 4).

	Nr. der Untersuchung	Anzahl der Untersuchungswerte	Durchschnitt	Schwankungsbereich	Angaben aus der Literatur
1	Isoliertstellung der letzten Samenmenge	26	vor 49 Tagen	vor 2 - 12 Tagen	Belonoschkin (19) 4-7 Tage Farris (55) 5 Tage Joel (68) 4-7 Tage Mc Cormick (130) 7 Tage McLeod u.a. (134) 3 Tage
2	Untersuchung in Stunden nach der Ejakulation	33	40 Std.	1-32 Std.	Belonoschkin (9) 30-60 min Falk u.a. (53) 45 Std Joel (68) 30-60 min McLeod u.a. (134) 55 Std.
3	Ejakulatvolumen in cc	33	3.5 cc	1.0 - 7.0 cc	Belonoschkin (9) 2-0 cc Benninghoff (12) 3.5 cc Falk (53) 2.9 cc Farris (55) 4.0 cc Hinglais u.a. (79) 3.1 cc Hochkiss u.a. (63) 3.3 cc Joel (68) 3.3 cc Mc Cormick (130) 3.5 cc McLeod (132) 3.4-3.6 cc Moench (146) 3-4 cc Simmons (196) 3.5 cc Shasny (198) 3.4 cc Tyler (214) 3-5 cc
4	pH	33	8.0	7.5 - 8.5	Belonoschkin (9, 10) 6.7 - 7.4 Joel (68) 8.3 Tyler (214) 7.2
5	Spermienzahl pro cc	33	64.6 Millionen pro cc	0 - 190.75 Millionen pro cc	Belonoschkin (9) 60-90 Benninghoff (12) 70 Falk (53) 100.7 Joel (68) 100 McLeod (132) 74-90 Moench (146) 100 Shasny (198) 60 Tyler (214) 60 Millionen/cc
6	VE / cc hyaluronidase	33	0.0933 VE/cc	0-0.2871 VE/cc	
7	Lebensdauer in Stunden	30	104.4 Std.	40 - 214 Stunden	Joel (68) 195 Std.
8	Resistenz geg. NaCl in min	30	48.3 min	20 - 120 Minuten	
9	aktives Sperma in % bei 20°C	30	60.6 %	10 - 65 Prozent	Falk (53) 61 % Farris (55) 44 % Joel (68) 60 % Mc Cormick (130) 61 % McLeod u.a. (134) 54-61 %
10	Färbung nach Caruella-Dalmat in %	30	54.6 % tote Spermien Referenzwert 2.80 % für die Geschlechtsverengung		
11	abnorme Spermien in %	30	18.7 %	9 - 65 Prozent	Belonoschkin (9) 20 % Falk (53) 11.0 % Farris (55) 13 % Joel (68) 15-20 % Mc Cormick (130) 17 % McLeod u.a. (134) 18-23 % Tyler (214) 15 %

Zu den einzelnen Untersuchungsergebnissen seien noch folgende Erklärungen gegeben:

Die Untersuchungen wurden im allgemeinen entsprechend den üblichen Vorschriften durchgeführt, d. h. es wurde

- zu 1. gemeinhin vor der Untersuchung eine Ejakulationspause von ca. 5 Tagen eingehalten und
- zu 2. die Untersuchung wurde innerhalb der ersten 5 Stunden nach der Samengewinnung durchgeführt, was sich auch aus technischen Gründen hin und wieder ohne Verzögerung nicht vermeiden ließ.
- zu 3. Das Durchschnittsvolumen entspricht ganz den Ergebnissen anderer Untersucher.
- zu 4. Die geringe Abweichung des pH-Durchschnittswerts gegenüber den aus der Literatur bekannten Größen erklärt sich aus der nur groben Orientierung mit dem pH-Universalindikator.
- zu 5. Die etwas geringen Werte der Spermadurchschnittszahlen sind durch die Tatsache bedingt, daß in die Aufstellung drei aspermatische Ejakulate einbezogen wurden, die z.B. von M c L e o d (133) und anderen Autoren ausgeschlossen wurden, fernerhin wohl auch dadurch, daß die Karenz von einzelnen untersuchten Personen, die zur Sterilitätsuntersuchung kamen, nicht strikt eingehalten worden war.
- zu 6. Vergleichszahlen für den Hd-Gehalt waren wegen der verschiedenen Untersuchungsmethoden nicht erhältlich, doch sei hier auf die Arbeit von R i i s - f e l d t (176) hingewiesen, die später noch besprochen werden soll.
- zu 7. Lebensdaueruntersuchungen sind von J o e l u. Mitarb. (88, 91) unter etwas modifizierten Bedingungen bereits ausgeführt worden. Neben der B a - k e r - Lösung (7) als bester Verdünnungsflüssigkeit ermittelte dieser Autor die Zimmertemperatur (18°C) als günstigsten Temperaturbereich. Er stellte bei seinen Untersuchungen (Verdünnung des Spermas

mit Färbefärbung: 1.1.1.1.1.

Stunden fest.

zu 10.

Vergleichszahlen für die Testosteronpräparation 1 %ige NaCl-Lösung bei der Verdünnung 1:10 liegen noch nicht vor.

zu 11.

Die Schätzung der Anzahl, d.h. beweglichen Spermien zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, jedoch liegen die Durchschnittszahlen der Spezialfärbung für tote Spermien in der Modifikation nach T o r u e l l a - D a l m a u (212) um ca. 35 % zu hoch, was wohl dahin zu deuten ist, daß noch bewegliche Spermien bereits in ihren Lebensfunktionen so geschädigt sind, daß sie dem Eindringen des Eosin-Färbestoffes keinen Widerstand mehr entgegenzusetzen können. Die Methode ist mit einer Fehlerbreite von ca. 50 % gegenüber der Schätzung der Beweglichkeit als Maß für die Lebensfähigkeit der Spermien zwar nicht von großem diagnostischem Wert, jedoch ist sie gegen die Abweichungen von $\pm 100\%$ bei der M o r o s o w ' schen Färbung und von $\pm 90\%$ bei der Modifikation nach B l o m , wie sie sich bei der Untersuchung von Bullensperma ergeben haben, um einiges brauchbarer.

zu 11.

Obwohl die Prozentsätze von abnormen Spermien bei den einzelnen Untersuchungen nicht direkt vergleichbar sind, da verschiedene Klassifikationen verwendet und unterschiedlich präzise Beurteilungen vorgenommen wurden, so liegen dennoch die Durchschnittswerte sehr gut beisammen.

Aus allen diesen Feststellungen kann geschlossen werden, daß das Untersuchungsmaterial, welches für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung stand, im wesentlichen den Mittelwerten entsprach, die von anderen Autoren an größeren Zahlen gefunden wurden, so daß auch die Ergebnisse, die von dem eigenen zahlenmäßig kleinen Material stammen, nach statistischer Sicherung als Mittelwerte interpretiert werden können.

In drei Ejakulaten von zwei Patienten waren Spontanviskositäten nachzuweisen.

Die eine Versuchsperson war ein 26-jähriger Student, der in einer sonst unauffälligen Anamnese eine im 19. Lebensjahr operativ beseitigte Kretatio testis aufwies. Der Patient gab an, daß der Chirurg ihm damals für eine Zeugungsfähigkeit nicht habe garantieren können. "Da die Versorgungsgefäße sehr kurz gewesen seien." Die Testes waren im Scrotum, jedoch anormal klein. Die sekundären Geschlechtsmerkmale waren ausgebildet. Das Ejakulat zeigte nur einige Kristalle. Dieser Patient wurde zweimal untersucht und beide Ejakulate zeigten eine geringe Fermentaktivität, die über den Spontanviskositätsabfall der Substratlösung hinausging. Es blieb unklar, ob diese Aktivität durch eine nicht mehr meßbare Hd-Menge verursacht war, wie es von Schurber u. Mitarb. (193) berichtet wurde, oder durch schon erwähnte andere Fermentkomplexe, wie sie von Lundquist u. Mitarb. (121) und Eichenberger (46) entdeckt wurden.

Der zweite Patient, 29 Jahre, kam zum Ausschluß einer Sterilität, nachdem bei der Ehefrau kein pathologischer Befund erhoben werden konnte.

Das äußere Genitale zeigte keine Besonderheiten. Anamnestisch ist ein Unfall vor 8 Jahren bemerkenswert, der mit einer Wirbelsäulenverletzung einherging und dessentwegen ein Stützkorsett getragen wurde. Sekundäre Geschlechtsmerkmale normal.

Die viskosimetrische Untersuchung des Ejakulates zeigte keine über den spontanen Abfall hinausgehende Senkung der HS-Viskosität.

Auch bei der menschlichen Versuchsreihe wurde die Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von der Spermienzahl pro cem untersucht und aus den schon erwähnten Gründen wurde ebenfalls die doppelt logarithmische Darstellung gewählt.

Der Bravais-Pearson'sche Korrelationskoeffizient beträgt für die Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von der Spermienkonzentration bei der untersuchten menschlichen

Versuchsreihe

$$r = 0,802 \pm 0,086$$

und liegt somit nur gering unter dem Wert, der für Bullensperma angegeben wurde. Von H o s e m a n n (82) wird 27-28 Freiheitsgrade ein Zufallshöchstwert von $r = 0,528$ gefordert. Da dieser überschritten wurde, ist die Existenz einer starken Korrelation statistisch gesichert.

Die mathematische Beschreibung lautet:

logarithmischen Ableitung ergibt

$$y = 0,6522 x - 2,216.$$

Als Regressionslinie der Konzentrationen ergibt sich folglich:

$$y = x^{0,6522} : 0,0061$$

wenn y in VE/cm und

x in Millionen Spermatozoen pro cm gemessen wird.

Es zeigt sich also, daß eine potenzfunktionale Abhängigkeit zwischen dem Hd-Gehalt und der Spermienkonzentration besteht in Bereichen zwischen 0 und 300 Millionen Spermatozoen pro cm vorliegt (Abb.6).

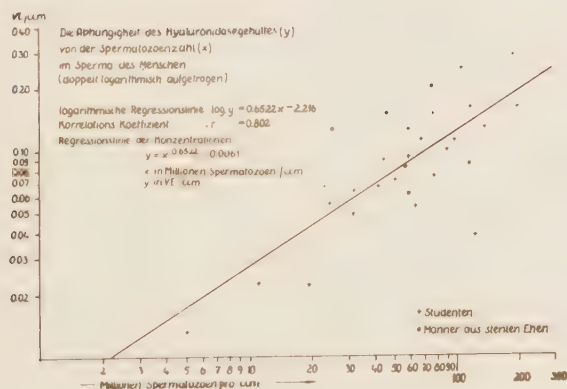


Abb.6. Die Abhängigkeit des Hyaluronidasegehaltes (y) von der Spermatozoenzahl (x) im menschlichen Sperma.

Da aus obiger Formel nicht direkt geschlossen werden kann, daß die Regressionslinie bei $x = 0$ durch $y = 0$ ist wie schon erwähnt wurde, so muß auch aus den Ergebnissen der geschilderten Beobachtungen bei den Aspermien diese Frage offen gelassen werden.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von M i c h e l s o n u. Mitarb. (143, 144) zu erwähnen, die bei Aspermien einen Hd-Durchschnittswert von 0,055 mgr Hd pro cem ermittelten und bei 17 gesondert geschilderten Fällen diesen Nachweis als Test für die Durchgängigkeit des Vas deferens verwendeten. Auch M o e n c h (146) beschrieb den Verschuß der abführenden Samenwege beim Fehlen von Hd im Ejakulat. S h u r b e r u. Mitarb. (193) konnten bei Aspermieejakulaten, deren Hd-Gehalt sich dem viskosimetrischen Nachweis entzog, noch die Anwesenheit des spreading factor durch den Ausbreitungs-Test in der Haut des Kaninchens nachweisen.

Aus der Verteilung der Untersuchungsergebnisse der Ejakulate von Männern aus sterilen Ehen innerhalb des Kurvenverlaufs ergibt sich schon augenfällig, daß ein genereller Unterschied zu der Studentengruppe nicht besteht. Ein solches Abhängigkeitsintercorrelation (für Männer aus sterilen Ehen $y^2 = 0,0053 x$ und für Kontrollen $y^2 = 0,0059 x$) wie ihn M i c h e l s o n u. Mitarb. (143) angegeben haben, ist statistisch nicht begründbar.

Andere Abhängigkeiten des Hd-Gehaltes, z.B. von der HCl-Resistenz, der Lebensdauer, dem Prozentsatz abnormer Formen und dem Volumen des Ejakulates wurden ebenfalls geprüft, konnten aber statistisch nicht gesichert werden. S h u r b e r u. Mitarb. (193) konnten gleichfalls keine Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von der Morphologie oder der Motilität der Spermien ermitteln.

III. Diskussion der Ergebnisse.

Der Versuch, die Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von Spermienkonzentration näher zu bestimmen, wurde bereits von verschiedenen Autoren untersucht. Aus mancherlei Gründen haben sich aber bisher keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielen lassen. Diese Gründe sind darin zu sehen, daß verschiedene Untersuchungsmethoden für den Hd-Gehalt (Viskosimetrie und Turbidimetrie) verwandt wurden. Auch diese wurden noch wieder unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Modifikationen ausgeführt, so daß ein direkter Vergleich, auch unter Umrechnung auf mgr Ferment pro cem Sperma nicht möglich ist.

Wenn hier dennoch der Versuch gemacht wird, die aus der Literatur erhältlichen Angaben untereinander zu vergleichen, so geschieht dieses deshalb, weil sich daraus bedingt einige Schlüsse ziehen lassen.

a) Der erste grob orientierende Versuch wurde schon von P i n c u s u. Mitarb. (162) und F e k e t e u. Mitarb. (57) unternommen und zum ersten Male für mehrere Tierarten von S w y e r (204) dargestellt, ohne daß jedoch eine volle statistische Sicherung erreicht werden konnte.

1.) Die bekannt gewordenen Literaturangaben sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Sämtliche Abhängigkeitsangaben für das Verhältnis von der Spermienkonzentration zum Hd-Gehalt im Bullensperma sind linear. Auch der Wert aus den eigenen Untersuchungen ist linear aufzufassen. Die Korrelation ist sehr hoch, die einzige viskosimetrische Angabe errechnet $r = 0,813$, jedoch zeigen die graphischen Darstellungen anderer Autoren auch Korrelationen, die als stark einzuschätzen sind.

Tabelle 2.

Zusammenstellung der bekanntgewordenen Angaben über die Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von der Sparmatonzahl (cem) beim Ruilen.

(y = Hd-Gehalt pro cem ; x = Sparmatonzahl pro cem bzw. cem)

Autor	Zahl der Untersuchungen	geschätzte oder angegebene Abhängigkeit	Korrel. koefiz.	Untersuchungsmethode
Jaquet u. a. (85)	nicht angegeben	"gewisse Relation"	—	nicht angegeben
Johnston u. a. (94, 95)	100	$y = 0.301x + a$	0.697	turbidimetrisch
Sallmann u. a. (186, 187)	nicht angegeben	—	0.2789	—
Dalgaard-Mikkelsen (35)	30	$y = 0.58x + b$	streng	viskosimetrisch
und Mitarbeiter (37)	53	$y = 0.6x + c$	—	
Swyer (204)	5	$y = 0.7x + d$	—	
Eigene Untersuchungen	39	$y = x^{1.095} \cdot e$	0.813	—

a-e ist eine für die jeweilige Hd-Einheit zur Umrechnung notwendige Konstante.
(z.T. mit einem Kurvenkorrektionsfaktor)

2.) Die Korrelationskoeffizienten der turbidimetrischen Angaben sind auffällig niedrig, bedingt durch die Angabe von Sallmann u. Mitarb. (186, 187), der auf einer nicht genannten, aber "sehr großen" Zahl von Untersuchungen basiert.

Es liegt der Schluß nahe, daß beide Untersuchungsmethoden auf grundsätzlich verschiedenen physikochemischen Vorgängen beruhen. Auf anderen Wegen sind auch verschiedene Autoren zum gleichen Ergebnis gekommen. So glaubt Meyer (139) auf Grund seiner fermentchemischen Analysen feststellen zu können, daß die turbidimetrische Meßung auf der Hydrolyse der acetylglukosaminischen Bindung beruht, die viskosimetrische dagegen im Initialabfall auf der (Hydrolyse)

unhygienischen, im Sekundärstadium auf Lösung der azeotylglukosaminischen Glieder. Vielfach hierin die Erklärung der Unterschiede zu sehen. E. N. B. E. R. G. E. Z. (197) hält die viskosimetrische Methode für zuverlässiger als die

Untersuchungen über die Abhängigkeit des H₂O-Gehaltes von der Spermienkonzentration beim Menschen sind naturgemäß zahlreicher.

1.) Von den Angaben in der Literatur sind aber viele zur vergleichende Untersuchung ungeeignet, da sie sich auf den Hinweis einer Proportionalität beschränken, ohne eine statistische Auswertung zu enthalten. Der Vollständigkeit halber seien sie hier aufgeführt, zumal einige in den graphischen Darstellungen kurvenmäßige Proportionalitäten ersichtlich zu machen scheinen.

Tabelle 6.

Autor		Zahl der Untersuchungen	Untersuchungsmethode.
Atary u. Mitarb.	(197)	—	viskosimetrisch
Kurzrok u. Mitarb.	(105)	90	
Leonard u. Mitarb.	(112)	—	
Wodine u. Mitarb.	(153)	41	
Ballerio u. Mitarb.	(51)	40	viskosimetrisch.
Bergenstaal u. Mitarb.	(13)	30	
Eichenberger	(45)	76	
Giarola u. Mitarb.	(58)	150	
Greenberg u. Mitarb.	(67)	—	
Joel	(37, 86, 89)	76	
Risfeldt	(178)	38	
Rizatti	(177, 178)	121	
Shurber u. Mitarb.	(193)	44	
Vandelli	(215, 216)	42	

Die übrigen Autoren versuchten die Abhängigkeit genauer zu fassen. Zur besseren Übersicht sind ihre Ergebnisse, die alle viskosimetrisch gewonnen wurden, in der Tabelle 7 dargestellt. Hier zeigte sich, daß von 6 genaueren Darstellungen nur S w y e r (204) zu einem linearen Verhältnis $\log \eta$ - $\log$ Hd-Gehaltes mit sehr hoher Korrelation. Die anderen nahmen eine potenzfunktionale Abhängigkeit an und stellten diese in einem doppelt logarithmischen Koordinatensystem dar.

Es finden sich Potenzfaktoren zwischen 0,5 und 1,2, die für derartige Kurven keine allzugroßen Unterschiede darstellen. Der Mittelwert für die viskosimetrische Bestimmung der Abhängigkeit des Hd-Gehaltes von der Spermienkonzentration dürfte somit eine potenzfunktionale Kurvenform mit einer Potenz von 0,7 bis 0,85 haben. Es liegen vier Korrelationskoeffizienten vor, drei sind in der Tabelle 7 zu finden, den vierten gaben G i a r o l a u. Mitarb. (58) mit 0,77 an. Es scheint demnach eine starke Abhängigkeit vorzuliegen.

Eine besondere Stellung nehmen die turbidimetrischen Messungen von K u r z r o k u. Mitarb. (106) ein. Auf die Unmöglichkeit, turbidimetrische Messungen mit viskosimetrischen vergleichen zu können, wurde schon hingewiesen, aber die Untersuchungen mehrerer Autoren zeigen eine enge Korrelation auch über den von K u r z r o k auf 50 - 100 Millionen Spermatozoen pro ccm eingeschränkten Bereich hinaus.

K u r z r o k u. Mitarb. (106) berichten allein über 13 von 58 Ejakulaten mit über 50 Millionen Spermien/ccm, bei denen sie keinen Hd-Gehalt nachweisen konnten, das sind 22,5 %. Turbidimetrisch haben weder P e r l o f f u. Mitarb. (158) noch L e o n a r d u. Mitarb. (112) ein Fehlen des Fermentes in Ejakulaten mit Spermien festgestellt, nachdem P e r l o f f den von ihm mitgeteilten Fall (156) später auf irreführende Werte der K u r z r o k ' schen turbidimetrischen Methode der Hd-Gehaltsbestimmung zurückgeführt hat (157).

Dagegen konnte bei 1143 viskosimetrischen Spermauntersuchungen dieser Zustand, d.h. das Fehlen von Hd bei Anwesenheit von Spermatozoen im Ejakulat nur dreimal nachgewiesen werden (0,26 %). Es sind dies die Fälle, die von M i c h e l s o n u. Mitarb. (141) und B a l l e r i o u. Mitarb. (5) berichtet werden. In letzterem Falle sind es allerdings zwei Ejakulate mit Spermienzahlen von unter 3,2 Millionen Spermatozoen / ccm, deren Hd-Gehalt sich möglicherweise dem Nachweis entzog.

Diese Diskrepanz kann nicht zufällig sein, sondern scheint in den unterschiedlichen Nachweismethoden begründet zu liegen, wie dies schon von E i c h e n b e r g e r (47), F a v i l l i (56) und P e r l o f f (157) vermutet wurde, ein weiterer Beweis für die Unmöglichkeit, Ergebnisse dieser beiden Methoden zu vergleichen.

Sodurch wird die Spezifität der Beziehung
der turbidimetrischen Messung der Hd überhaupt frag-
lich und die Existenz einer Sterilität durch Azo-
spermie bei normaler Spermienzahl zweifelhaft.

D a l g a a r d - M s a k e l s e n u. Mitarb.
(37) fordern, daß auch für andere Säugetiere ein
Fehlen der Hd bei normaler Spermatozoenzahl nachge-
wiesen werden müßte, sofern in ihrem Sperma über-
haupt jemals das Ferment gefunden wurde, was nach
R o w l a n d s (184) nicht in allen Fällen zu-
trifft. Bisher wurde jedoch noch nie etwas über der-
artige Ergebnisse berichtet.

Ein Vergleich der Abhängigkeiten des Hd-Gehaltes
von der Spermatozoen-Konzentration zwischen Bullen- und
Menschensperma zeigt zwei voneinander verschiedene Kur-
venformen.

Beim Rind folgt das Verhältnis einer linearen Funk-
tion, beim Menschen einer Potentialfunktion. Eine genaue
Festlegung der Kurven kann natürlich erst erfolgen, wenn
Untersuchungen an größerem Material unter gleichen Ver-
suchsbedingungen stattgefunden haben.

Für den normalen Durchschnittswert von 1 000 Milli-
onen Spermatozoen/ccm beim Bullen ergeben sich nach den
eigenen Untersuchungen etwa 425 VE/ccm Hd, das sind
0,425 VE für 1 Million Spermatozoen in diesem Bereich.

Bei der Annahme eines normalen Konzentrationsdurch-
schnittes von 72 Millionen Spermatozoen/ccm beim Men-
schen erhält man nach den eigenen Untersuchungen etwa
0,1 VE/ccm Hd, das sind für 1 Million Spermatozoen in
diesem Bereich 0,0014 VE.

Die Bullenspermatozoen enthalten also im Durch-
schnittsbereich etwa 300 mal mehr Hd als die Menschen-
spermatozoen. Somit kann die Angabe von P e r l m a n n
u. Mitarb. (155) nicht bestätigt werden, die bei turbi-
dimetrischer Messung ein Fermentgehaltsverhältnis von
Mensch : Bulle von 1 : 6,2 bis 1,15 errechneten.

Worin der Unterschied im Fermentgehalt zwischen Bullen und Menschen begründet ist, kann mit Sicherheit nicht gesagt werden. Nach D a l g a a r d - M i k - k e l s e n (35) ist das Fermentdenot in der Galea capitis nach K a o u. Mitarb. (168, 169) in der sog. cytoplasmatischen Kappe anzubekommen. Bei dem Unterschied in der Größe zwischen den Spermatozoen des Bullen und des Menschen wäre es denkbar, daß der größeren Oberfläche auch ein größerer Fermentgehalt entspricht. Aber solche Erörterungen würden über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Jedenfalls lassen der unterschiedliche absolute und relative Fermentgehalt und der verschiedene Kurvenverlauf der Abhängigkeit des Fermentgehaltes von der Spermatozoenzahl eine Übertragung der in Tierexperiment gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen nicht ohne weiteres zu.

Die Wirkung der Hd auf die Lebensdauer der Spermatozoen nach der Verdünnung des Samens ist ebenfalls zu untersuchen. An Hd war es wichtig festzustellen, welche Wirkung experimentell hinzugefügte Hd auf die Spermatozoen haben würde.

Es wurde die Hd-Wirkung auf die Lebensdauer der Spermatozoen von 19 nicht ausgewählten menschlichen Ejakulaten bestimmt.

a) Methodik:

Zwei Spermaproben von je 0,1 ccm Gesamtsperma wurden 1 : 4 mit Glukose-Phosphat-Verdüner für Menschen nach B a - k e r (7) verdünnt, und zur einen Probe eine Trockenampulle Hyaluronidase "Bayer" hinzugefügt. Eine Trockenampulle Hyaluronidase "Bayer" in 1 ccm Lösungsmittel entspricht etwa 7,35 VE/ccm. Da sie in dieser Versuchsanordnung jedoch in 0,4 ccm aufgelöst wurde, entsprach die Fermentkonzentration etwa 18,3 VE/ccm, einer Hd-Menge, die den Gehalt der Spermaprobe um ein Vielfaches überstieg.

Die andere Probe diente zur Kontrolle.

Beide Versuchsansätze wurden von der Luft durch flüssiges Paraffin abgeschlossen und die Ablesung erfolgte 6 - 8 stündlich, bis keine Beweglichkeit mehr zu beobachten war.

b) Ergebnisse:

Die durchschnittliche Lebensdauer bei den Kontrollversuchen ohne Hd-Zusatz betrug 101,4 Stunden, ungefähr der bei den gesamten Versuchen ermittelten durchschnittlichen Lebensdauer von 104,4 Stunden entsprechend.

Die durchschnittliche Lebensdauer der mit Hd versetzten Samenproben betrug 113,6 Stunden, d.h. es trat im Durchschnitt eine Lebensdauerverlängerung von 12,2 Stunden ein. Dieses Ergebnis erweist sich allerdings in der statistischen Auswertung nur als scheinbar. Da 6-8 stündlich abgelesen wurde, wurde die Fehlerbreite mit 6 Stunden angesetzt. Das S^2 -Äquivalent für $n = 19$ Beobachtungen beträgt nach R o s e m a n n (82) 3,5. So-

mit ist der dreifache mögliche Fehler 27 Stunden größer als die ermittelte Lebensdauerverlängerung.

Dagegen kommt man zu weit klaren Ergebnissen, wenn man die gesamten Versuche in solche unterteilt, bei denen eine Lebensverlängerung, und solche bei denen eine Lebensverkürzung eintrat.

Von den 19 Spermaproben stieg nämlich nach Zufügung von Hd bei 9 Ejakulaten die Lebensdauer von durchschnittlich 90,3 Stunden auf 137 Stunden. Der dreifache Fehler (3- σ -Äquivalent nach H o s e m a n n (82) = 4,5) beträgt 25,8 Stunden. Somit ist für diese 9 Proben die Verlängerung der Lebensdauer statistisch gesichert.

8 Spermaproben zeigten dagegen eine Verkürzung der Lebensdauer von 127 Std. auf 103,6 Std. Der dreifache Fehler (3- σ -Äquivalent nach H o s e m a n n (82) = 4,5) beträgt 27 Stunden, womit für diese 8 Proben die Lebensdauerverkürzung statistisch zwar nicht voll gesichert, aber doch sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte.

8 Proben zeigten nach dem Vorversuch keine Veränderung der Lebensdauer.

c) Diskussion:

Eine einheitliche Verlängerung oder Verkürzung der Lebensdauer für menschliche Spermatozoen durch Hd-Zugaben in die Verdünnungsflüssigkeit konnte also nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man die 9 Spermaproben, bei denen eine Verlängerung der Lebensdauer (von 90,3 auf 137 Stunden) eintrat so ist festzustellen, daß es sich um solche handelt, bei denen die Kontrollen (ohne Hd-Zusatz) eine gegenüber dem Gesamtdurchschnitt von 90,3 Stunden (90,3 gegenüber 101,4 Std.) Lebensdauer zeigten.

Bei den 8 Spermaproben, bei denen ein Hd-Zusatz eine Lebensdauerverkürzung (von 127 auf 103,6 Stunden) hervorrief, handelt es sich um solche, bei denen die Kontrollen (ohne Hd-Zusatz) gegenüber dem Gesamtdurchschnitt von 90,3 Stunden (127 gegenüber 101,4 Stunden) Lebensdauer zeigten.

Es scheint demnach, daß Hd bei Spermatozoen von allgemein geringer Lebensdauer lebensverlängernd wirkt, bei

experimenten von 500 mg, 100
 mg, 50 mg, 25 mg, 10 mg
 bei als absolute Dosis (100
 mg), als Dosis pro kg Körper-
 gewicht (10 mg/kg) und
 (10 mg/kg) gewichtet

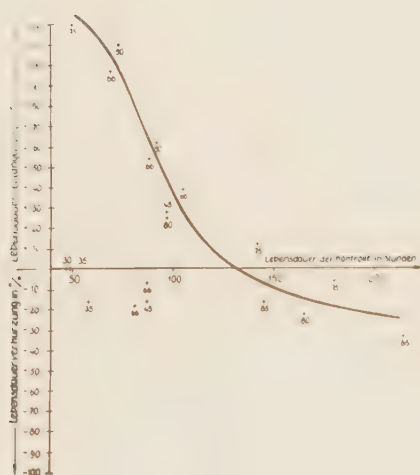


Abb. 7. Die Lebensdauererhöhung der Kontrollen bei
 Hyaluronidasezusatz in Abhängigkeit von der Le-
 bensdauer der Kontrollen (ohne Hyaluronidase) und
 vom Prozentsatz der aktiven Versuchstiere.

Sechs Punkte, die nicht in den Kontrollreihen zu gehören sämtlich zu denjenigen Spermaproben, die in diesen Kontrollen eine unterdurchschnittliche Lebensdauer zeigten. Außerdem handelt es sich um Proben, bei denen eine ungewöhnliche geringe Zahl beweglicher Spermatozoen festgestellt wurde, nämlich eine Probe mit 30 %, zwei Proben mit 35 %, eine Probe mit 45 % und zwei Proben mit 65 % Motilität. Diese Spermaproben waren also in ihrer Vitalität stark herabgesetzt und reagierten vielleicht deshalb anormal.

In der Literatur wurde als direkte Wirkung der Hd auf menschliche Spermatozoen von M o r i c a r d (149) und H a g e d o r n (71) nur über eine enorme Belebung im Nativpräparat und Steigerung der Aktivität der Samenzellen berichtet, wie sie bei Zusatz keiner anderen Wiederbelebungsflüssigkeit beobachtet werden konnte. Nach H a g e d o r n u. Mitarb. (72) verstärkt die Hd auch die vis a tergo beim Eindringen in den Kristeller'schen zervikalen Schleimpfropf.

C h a n g (30) beobachtete im Gegensatz dazu keine Beeinflussung der Motilität durch Hd-Zusatz am Kaninchensamen. J o e l (88) und K i c h e n b e r g e r u. Mitarb. (48) erzielten durch Fruktose eine Verlängerung der Lebensdauer menschlicher Spermien, während K o k (100) berichtet, daß das Verhältnis von Salzen zu Hexosen für das Überleben von Spermien ausschlaggebend sei.

Nach jeder der drei Zentrifugationen wurde die noch aktive Spermien festgestellt.

24 Stunden nach der 2. Zentrifugation wurde die Flüssigkeit filtriert und die Hd-Bestimmung als der beschriebenen viskosimetrischen Methode vorgenommen.

b) Ergebnisse:

Die Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

- 1.) Es wurden wechselnde Mengen, die aber niemals mehr als $\frac{2}{3}$ des Gesamtgehaltes an Hd im Vollsperma ausmachten, aus der Spermaflüssigkeit gewonnen und aus den Spermien herausgewaschen.
- 2.) Die herauswaschbare Hd wurde bereits ganz überwiegend in der 1. Waschflüssigkeit festgestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8.

Versuch Nr.	1. Waschflüssigkeit in Prozent der Gesamt-Hd-Konzentration	2. Waschflüssigkeit
2	58,5	0,92
3	66,8	0,96
4	25,3	0,98
5	34,5	0,90
6 a	24,9	0,36
6 b	26,4	0,35

- 3.) In zwei Fällen der in Tabelle 8 zusammengefaßten Versuchsergebnisse der Resorptionsversuche konnte eine einwandfreie Wiederaufnahme von Hd durch die Spermien nachgewiesen und statistisch gesichert werden. (Versuch Nr. 5b II und 6a II.) Dieses sind gerade jene Versuche, die nach Versuchsende hohe Prozentsätze beweglicher Spermatozoen zeigten. Die Ausgangswerte lagen zwischen 90 und 100 % beweglicher Spermien.

Versuch Nr	Sediment von -ccm Sperma	Hd-Konzentration der Suspensionskonzentration (Mittelwert)		Zunahme oder Abnahme $M_1 - M_2$ in VE/cum	$\bar{G}_{\text{Hd}}$ in VE/cum	$\frac{M_1 - M_2}{\bar{G}_{\text{Hd}}}$	m. Diff. auf	Prozentab- weichung der Spermatiden von der Vermutung	Sensitivität unterschied und der Wiederholungs-
		Anfangs- konzentration M_1 in VE/cum	End- konzentration M_2 in VE/cum						
3a I	0.25	0.1	0.1	+0.5	0.15	4.3	12	5 %	
3a II	0.25	0.1	0.1	+7.2	0.42	1.5		2 %	
3b I	0.15	0.1	0.1	+10.3	0.53	19	12	1 %	
3b II	0.15	0.1	0.1	+8.1	0.42	19		1 %	
4a I	0.4	0.2	0.2	+4.7	0.07	69	0	nicht angegeben	
4a II	0.4	0.2	0.2	+12.1	1.1	11			
4b I	0.4	0.2	0.2	+5.0	0.14	36	17	nicht angegeben	nicht gesichert
4b II	0.4	0.2	0.2	+2.4	1.01	2.3			
5a I	0.45	0.2	0.2	+9.6	0.20	49	2	30 %	
5a II	0.45	0.2	0.2	+1.5	0.72	2.1		50 %	nicht gesichert
5b I	0.15	0.2	0.2	+3.5	0.55	6.2	2	60 %	nicht gesichert
5b II	0.15	0.2	0.2	+6.2	0.50	12.4		50 %	Aufnahme gesichert
6a I	0.25	0.2	0.2	+1.9	0.15	260	0	30 %	
6a II	0.25	0.2	0.2	+0.5	0.12	464		50 %	Aufnahme gesichert
6b I	0.25	0.2	0.2	+0.4	0.15	9	0	20 %	
6b II	0.25	0.2	0.2	+1.55	0.16	1.4		30 %	

Bemerkungen: In Gruppe 6a wurde Sperma vom 1 Sprung, in Gruppe 6b Sperma vom 2 Sprung verwendet

$$\bar{G}_{\text{Hd}} = \sqrt{\frac{M_1}{M_2} + \frac{M_2}{M_1}}$$

t ist das 3-6-Äquivalent für den mittleren Fehler der Differenz bei kleiner Beobachtungszahl (nach Rosemann (62)). Es beträgt für n=6 Beobachtungen (5 Freiheitsgrade) t=0.0

Diskussion:

Die Resorptionsversuche wurden an Ballensperma ausgeführt, weil es in ausreichender Menge zur Verfügung stand und eine große Spermienkonzentration besitzt, die einerseits größere Resorptionsunterschiede verschaffen und andererseits infolge der größeren Hd-Konzentration durch kürzere Reaktionszeiten den Nachweis erleichtert.

Die Einzelversuche wurden zu je zwei in einer Gruppe zusammengefaßt und zwar diente als Vergleichswerteigenschaft des geteilten Sedimentes die 1. Wase. Die eigenen Spermatiden - die auf dem Vorversuch basieren die geringere konzentrierte Suspensionen - wurden in 2. Wase besonders hergestellte Lösung (Dihydroxyäthylphosphat-Lösung).

Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob die Aufnahme von Hd durch die Spermien, welche die Resorption

von der Konzentration der Hd in der Flüssigkeit ab, und ob die semiothetische Hd sich von den in natürlichen Präparaten in der Wirkung unterscheiden.

Von 8 Versuchen mit konzentrierter Hd-Substanz ergaben sich in zwei Fällen (Versuche Nr. 15 II und 6a II) die Wiederaufnahme der Hd durch die Spermien einwandfrei statistisch bewiesen werden, was dadurch festgestellt wurde, daß der Gehalt der angewandten Lösung an Hd sich entsprechend verminderte. In allen Fällen wurde vor und nach der Einwirkung der Hd festgestellt, daß noch lebende, unbewegliche Spermien vorhanden waren.

Hieraus ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auch therapeutisch zugeführte Hd von den Spermatozoen aufgenommen und zum Ort der Befruchtung transportiert wird. Voraussetzung ist allerdings, daß die Konzentration der Hd genügend hoch ist. Ebenso wurde bewiesen, daß derjenige Teil der Hd, der überhaupt in Lösung geht, beinahe vollständig durch den 1. Waschprozess herausgebracht wurde. Im 2. Waschprozess konnten nur noch relativ unbedeutende Mengen gelöst werden.

Die Hd verhält sich also in ihrer Löslichkeit gegenüber Glukose-Phosphat-Verdüner für Rinder verschieden: ein Teil, und zwar auch wieder ein verschieden großer Teil, geht verhältnismäßig leicht und der Rest nur schwer, wenn überhaupt, in Lösung, solange nicht eine Zerstörung der Spermazellen eintritt. Die Versuche sagen nichts darüber aus, wovon es abhängt, daß einmal nur ein Viertel, das andere Mal zwei Drittel der Gesamt-Hd herausgewaschen werden können. Es läßt sich die Vermutung aussprechen, daß diese Löslichkeit abhängig ist von der jeweils anwesenden Zahl lebender und toter Zellen. Das würde mit den Beobachtungen von P e r l m a n n u. Mitarb. (155) und F a v i l l i (56) übereinstimmen, auf die bereits einmal hingewiesen wurde (Seite 42).

Damit eine Resorption von Hd stattfindet, ist es notwendig eine Suspensionsflüssigkeit so hoher Konzentration hinzuzufügen, daß ein Konzentrationsgefälle von der umgebenden Flüssigkeit zum Zellinhalt hin vorhanden ist. Um

diese Resorption massen zu können. ...
forderlich, daß genügend Zellen vorhanden
sind, noch eine Resorption erlaubt, auchfalls
der Unterschied in der Konzentration der
der ja allein meßbar ist, zu gering sein,
sich noch feststellen ließe.

Wenn es zutrifft, daß der biologische Zustand der
Zellen eine Rolle bei der Abgabe bzw. Aufnahme der Hd
spielt, wird wahrscheinlich bei jeder Versuch ein ge-
wisser Teil der Zellen Hd abgeben, der die Zellen be-
trifft, die z.B. unter den Versuchsbedingungen absterben,
und dadurch das Versuchsergebnis, soweit es die Messung
des resorbierten Fermentes betrifft, fälschen. Es ist
leicht zu erklären, daß gelegentlich mehr Hd abgegeben
als aufgenommen wird. Tatsächlich ist auch bei den übr-
igen Versuchen eine Konzentrationserhöhung der Hd in der
Suspensionsflüssigkeit festgestellt worden, die, wenn
die gemachte Annahme richtig ist, nicht bedeuten muß, daß
überhaupt keine Aufnahme durch die Spermien stattgefunden
hat, sondern nur, daß eine solche vielleicht durch eine
größere Hd-Angabe verdeckt worden ist, erklärlich durch
eine Schädigung der Spermien z.B. durch die Zentrifugation.

Im Sinne der dargestellten Annahme wird man mit der
beschriebenen Versuchsanordnung immer nur die Differenz
zwischen Hd-Abgabe und Aufnahme feststellen können, die
je nach dem Zustand der Zellen positiv oder negativ sein
kann. Als das wichtigste Ergebnis der Versuche wird der
einwandfreie Nachweis angesehen, daß eine Wiederaufnahme
von Hd durch die Spermien tatsächlich stattgefunden hat.

Alle übrigen Vermutungen, insbesondere die Annahme,
daß der biologische Zustand der Spermatozoen für die Wie-
deraufnahme der Hd von Bedeutung ist, haben nach den Ver-
suchsergebnissen eine hohe Wahrscheinlichkeit, sind aber
nicht als absolut gesichert anzusehen.

d) Literatur-Übersicht:

In der Literatur findet sich bisher nur ein einziger Ver-
such beschrieben, der für den Nachweis der Wieder-
aufnahme von Hd aus einer Suspensionsflüssigkeit spricht. Es m -

II. Zusammenfassung

- 1.) Es wird eine Übersicht über die bis Anfang 1953 erschienene Literatur über die Rolle der Hyaluronidase bei der Befruchtung des Säugetiereies gegeben.
- 2.) Es wird über 14 Bullenspermata und 33 menschliche Spermien und ihre Hyaluronidase-Aktivität, insbesondere die Aktivität des Hyaluronidase-Enzyms, berichtet. Die erhaltenen Versuchsergebnisse stimmen wesentlich mit den in der Literatur gemachten Angaben überein.
- 3.) Es wird für das menschliche Spermio-gramm die Prüfung der Zeit bzw. der Spermatozoenlebensdauer angegeben. Es wird eine Modifikation zur Prüfung der Spermatozoenlebensdauer angegeben und es werden die ermittelten Durchschnittswerte mitgeteilt. Ferner wurden drei Modifikationen der Unterschiedsfärbung für tote und lebende Spermien geprüft.
- 4.) Die Abhängigkeit des Hyaluronidase-Gehaltes von der Spermienzahl wurde für Bullen und Menschen bestimmt. Bei Bullen ergab sich eine lineare, für den Menschen eine potenzfunktionale Abhängigkeit. Die Korrelation zu diesen Regressionslinien war stark. Es werden die sich daraus ergebenden Folgerungen gezogen.
- 5.) Auf menschliche Spermien wirkt die Zugabe von Hyaluronidase in der Weise, daß die Lebensdauer der Spermien in Ejakulaten mit kurzer Spermienlebensdauer verlängert, in Spermata mit langer Lebensdauer der Spermien diese aber verkürzt wird.
- 6.) Bei Bullensperma ließ sich eine Adsorption von kugelförmiger Hyaluronidase durch die Spermien nachweisen, was die bisher empirisch geübte Therapie der Hyaluronidase-Verabreichung in gewissen Fällen von männlicher Sterilität tierexperimentell stützt.
- 7.) Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß die Infektion des Hyaluronidase durch die Spermien nicht von

- Survey of publications dealing with the influence of the ferment hyaluronidase on the fertilisation of mammalian eggs. Period covered : Publications up to the beginning of the year 1953.
- Reported is on 39 ejaculations of bulls and 33 sperms of men. Detailed spermograms are shown and the results obtained from the analyses of hyaluronidase are communicated. All average figures are in good conformity with findings of others.
- 3.) For the spermogram of men the test of the resistance of spermatozoons against hyaluronidase has been employed. The method of examining the vitality of spermatozoons has been modified and average figures obtained are stated. Furthermore more 3 various staining-methods for distinguishing between living and dead spermatozoons have been described.
- 4.) It has been examined, how far the contents of hyaluronidase are depending on the number of spermatozoons in a given sperm. These experiments have proved, that in sperms of bulls the proportion between contents of hyaluronidase and number of spermatozoons goes rectilinear, whereas, in case of men's sperms, this proportion can be expressed only by a line of potencial function. The correlations of these regressions-lines were very strong. Adequate conclusions have been drawn.
- 5.) Hyaluronidase, when added to men's sperm, will prolonged the life of spermatozoons belonging to ejaculations of short life-expectancy. However hyaluronidase artificially added to men's sperm of high vitality showed exactly the contrary effect, i.e. it shortened obviously the life of spermatozoons.
- 6.) It has been found out, that a resorption of hyaluronidase by sperm of bulls takes place, when a solution of artificial hyaluronidase has been added to the sperm. This

- 8.) Belonochkin, B.
 9.) Belonochkin, B.
 10.) Belonochkin, B.
 11.) Belonochkin, B.
 12.) Belonochkin, B.
 13.) Belonochkin, B.
 14.) Bergenstaal, D.M., Seitz, V.W.
 15.) Bielig, H.J., Maden, F.G.
 16.) Bishop, G.
 17.) Bortolau, R., Odor, L.
- Pseudologische Mitteilung.
 Pseudologische Mitteilung mit Name.
 Nature, Geneva, 152 (1946):
 Nature, London, 152
 Ann. ostetr. ginec., Milano, 72
 (1950): 387
 Grundbegriffe molekular statistischer Mechanik. 1. Auflage.
 G. Ellwiel, Stuttgart, 1950.
 Quart. J. exp. Physiol. 21 (1932):
 142
 Wien. med. Wochschr. 102 (1952): 877
 Biologie der menschlichen Spermatozoen in Konzeptionsgeschehen. 1. Auflage. G. Thieme, Leipzig, 1944.
 Der Mensch im Lichte der Spermatozoenlehre. 1. Auflage.
 Björbergs Förlag, Stockholm 1949
 Ann. ostetr. ginec., Milano, 75
 (1951): 1006
 Lehrbuch der Anatomie des Menschen. II. Band. 3. Auflage, Urban & Schwarzenberg, Berlin-München 1948.
 J. Amer. Med. Ass. 137 (1948): 150
 Die Zuckerkrankheit. G. Thieme, Stuttgart, 1949.
 Experientia, Basel, 5 (1949):
 Intern. Kongress für Gynaekologie, Juni 1947, Dublin, sit. nac.
 Anat. Rec., Philadelphia 103
 (1949): 93

- 43.) Davis, L.B., *Fertility and steril., N.Y.*, 1 (1950): 362
Ref. Ser. Biol., Berlin, Abt. B., 149 (1952): 95
- 44.) *J. dairy Sci.* 33 (1950): 390
- 45.) *Münch. Med. Wschr.* 95 (1953): 223
- 46.) *J. Biol. Chem., Baltimore*, 172 (1948): 377
- 47.) Dorfman, A., Ott, M.L. *J. Biol. Chem., Baltimore*, (1948): 367
- 48.) Dorfman, A., Ott, M.L., *J. Biol. Chem., Baltimore* 74 (1948): 621
- 49.) Duran-Reynals, F. *Compt. rend. Soc. biol., Paris* 99 (1928): 6
- 50.) Eichenberger, E. *Gynaecologia, Basel*, 121 (1946): 288
- 51.) Eichenberger, E. *Experientia, Basel*, 5 (1949): 241
- 52.) Eichenberger, E., Goosens C. *Experientia, Basel* 5 (1949): 1073
- 53.) Emmens, C.W., Swyer, G.I.M. *Nature, London*, 160 (1947): 718
- 54.) Emmens, C.W., Swyer, G.I.M. *J. Biol. Chem., Baltimore*, 30 (1949): 121
- 55.) Escuder, C.J. *An. Fac. med., Montevideo*, 21 (1936): 889
Ref. Ser. Biol., Berlin, Abt. B. 103 (1938): 114
- 56.) Evans, D.G., Perkins, F.T., *Lancet, London*, 6667 (1951): 1253
Gaisford, W.
- 57.) Falk, C., Kaufman, A.S. *Fertility and steril., N.Y.*, 1 (1950): 489
- 58.) Farris, E.J. *Experientia, Basel*, 3 (1947): 112
Diskussionsbemerkung zu Nr. 166
- 59.) Farris, E.J. *Brit. Med. J.* 4746 (1951): 1475
- 60.) Favilli, G. *Comm. I. Congr. Intern. di Fisiopatologia della Riproduzione, Milano* 1

aus: Hartmann, O.G., Atlas d.
Sex and internal secretion.
London 1936, zit. nach Nr. 44
Endocrinology, Springfield, Ill.

M., Ringelblat, M., Sem. hôp., Paris, 23 (1947): 24
zit. nach Nr. 131.
Biochem. Zschr., Berlin, 19 (1904)

Darwin-Rey- Science.N.Y., 72 (1930): 503

Die Grundlagen der statistischen
Methoden für Mediziner und Biologen.
1. Auflage. G. Thieme, Stuttgart
1949.

- Hotchkiss, R.S., Brunner, Amer. J. Med. Sci. 196 (1938):
E.K., Grenley, P. 362, zit. nach Nr. 131.
) Hultin, E. Svensk kem. tskr. 60 (1948):
) Jacquet, I., Flessis, Y., Compt. rend. Acad. sci., Paris,
Cassou, R. (1951): 1252
86.) Joel, C.A. Transact. Conf. Steril. Infert. 3
(1947): 91.
87.) Joel, C.A. Schweiz. Med. Wschr. 78 (1948): 203
88.) Joel, C.A. Studien am menschlichen Sperma.
2. Auflage. B. Schwabe, Basel 1953.
89.) Joel, C.A., Eichenberger, E. Schweiz. Med. Wschr. 75 (1945): 601
90.) Joel, C.A., Katschalsky, Ann. obstetr. gynec., Milano, 73
N. (1951): 890
91.) Joel, C.A., Tschumi, B. Schweiz. Med. Wschr. 75 (1945): 385,
zit. nach Nr. 88.
92.) Johnston, I.E., Mixner, I.P. J. Anim. Sci. 7 (1948): 440
93.) Johnston, I.E., Mixner, I.P. J. dairy Sci. 33 (1950): 847
94.) Johnston, I.E., Stone, E. J. dairy Sci. 31 (1948): 678
J., Mixner, I.P.
95.) Johnston, I.E., Stone, E.J., J. dairy Sci. 32 (1949): 574
Mixner, I.
96.) Johnston, I. H. med. Welt, Stuttgart, 1 (1950):

- 91.) Kaufman, A.S. Human Fertility, Baltimore 11 (1946): 3
- 92.) Klecker, E. Arch. Zschr. Berlin, 6 (1951): 536
- 93.) Klotz, H. Zschr. Berlin, 6 (1951): 536
- 94.) Kok, B. Science, 115 (1952): 498
- 95.) Kulonen, E. Acta physiol.Scand.17 (1949):171
- 96.) Kulonen, E. Acta physiol.Scand.24 (1951) Suppl. 38
- 97.) Kurzrok, R. (1947): 2
- 98.) Kurzrok, R. Amer.J.Clin.Path. 18 (1948): 491
- 99.) Kurzrok, R. Ann.N.Y.Acad.Sci. 52 (1950):1180
- 100.) Kurzrok, R., Leonard, S.L., Conrad, H. Amer.J.Med. 1 (1946): 491
- 101.) Kutscher, W., Wolbergs, H. Zschr.physiol.Chemie, Berlin, 236 (1935): 237
- 102.) Laves, W. Dtsch.Zschr.gerichtl.Med. 39 (1948): 207
- 103.) Leonard, S.L., Kurzrok, R. Endocrinology, Springfield, Ill., 37 (1945): 191
- 104.) Leonard, S.L., Kurzrok, R. Endocrinology, Springfield, Ill., 39 (1945): 85
- 105.) Leonard, S.L., Perlman, P. L. Anat.Rec., Philadelphia, 96 (1946): 543
- 106.) Leonard, S.L., Perlman, P. L., Kurzrok, R. Endocrinology, Springfield, Ill., 39 (1946): 261
- 107.) Leonard, S.L., Perlman, P. L., Kurzrok, R. Endocrinology, Springfield, Ill., 40 (1947): 199
- 108.) Leonard, S.L., Perlman, P. L., Kurzrok, R. Proc.Soc.Exper.Biol.Med., N.Y., 66 (1947): 517
- 109.) Leonard, S.L., Perlman, P. L., Kurzrok, R. Endocrinology, Springfield, Ill., 42 (1948): 176
- 110.) Lewis, W.H., Wright, E.S. Contr.Embryol.Carnegie Inst., Washington, 25 (1935): 113

- Univ. California Publ. Zool. 9
(1912): 365, with plate no. 293
- Science, N.Y., 115 (1952): 498
- Science, N.Y., 115 (1952): 402
- Science, N.Y., 115 (1952): 402
- Lehrbuch der Geburtshilfe.
2. Auflage. G. Thieme, Stuttgart
1952.
- J. Path. Bact., London, 33, 2 (1930)
: 1045
- J. Path. Bact., London, 54, 1 (1942)
: 384
- Nature, London, 150 (1942): 627
- Amer. J. Obstetr. Gynec. 61 (1951)
: 1020
- Fertility and steril., N.Y., 1
(1950): 347
- Fertility and steril., N.Y., 2
(1951): 115
- J. Urol., Baltimore, 66 (1951): 436
- Fertility and steril., N.Y., 2
(1951): 187
- Fertility and steril., N.Y., 2
(1951): 394
- J. Biol. Chem., Baltimore, 165
(1946): 533
- Transact. Conf. Steril. Infert. 3
(1947): 9
- Physiol. Rev., Baltimore, 27
(1947): 335

- 142.) Michelson, L.
 Michelson, L., Hama, S.O., J. Urol., Baltimore, 61 (1949): 771
 Koets, P.
- 144.) Michelson, L., Koets, P., J. Urol., Baltimore, 61 (1949): 801
 145.) Milowalow, V.K. Die künstliche Besamung der
 Haustiere. Moskau 1940.
 Zit. nach Nr. 65.
- 146.) Moench, G.L. in Seitz-Anreih: Biologie und
 Pathologie des Weibes. Band III,
 Seite 307. Urban und Schwarzen-
 berg, Berlin-Wien 1952.
- 147.) Monroy, A., Ruffo, A. Nature, London, 159 (1947): 605
 148.) Moore, K. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y.,
 69 (1948): 391
- 149.) Moricard, F. Gynéc. et obstétr., Paris, 45
 (1946): 781
- 150.) Morosow, V.A. Vestn. sel'skhoz. Nauki zivotn.
 1 (1940): 139, zit. nach Nr. 65.
- 151.) Niendorf, F. Arch. Gynäk., München, 180 (1951)
 : 234
- 152.) Niendorf, F. Münch. Med. Wschr. 95 (1953): 366
- 153.) Nodine, I.H., Perloff, W.H. Fertility and sterility, N.Y., 1
 (1950): 66
- 154.) Pellizari, C.R. Atti Soc. med. chir. Padova 21
 (1943): 400
- 155.) Perlman, R., Kurzrok, R. 42 (1948): 26
- 156.) Perloff, W.H. Transact. Conf. Steril. Infert. 3
 (1947): 111, Diskussionsbemer-
 kung zu Nr. 166.
 Persönliche Mitteilung.

- 165.) Pollak, O.J. *Endocrinology and Metabolism, N.Y.* 1 (1950): 353
Science, N.Y., 105 (1947): 391
Proc. Roy. Soc. London, Biol. Sci. 1947, 2: 239
- 166.) Pollak, O.J. *Exp. Zool.*, Philadelphia 195
- 167.) Pollak, O.J. *Arch. Biochem.*, N.Y., 19 (1949):
- 168.) Rao, C.K., Berry, R.O. *Winch. Med. Wschr.* 95 (1953): 377
Diskussionsbemerkung zu Nr. 41.
- 169.) Rao, C.K., Hart, G.H. *Delaware Med. J.* 19 (1947): 27
- 170.) Riisfeldt, O. *Transact. Conf. Steril. Infert.* 3 (1947): 103
- 171.) Riisfeldt, O. *Amer. J. Vet. Res.* 10 (1949): 357
- 172.) Riisfeldt, O. *Amer. J. Vet. Res.* 9 (1948): 117
- 173.) Riisfeldt, O. *Acta path. microbiol. Scand.* 1946 Suppl. 58
- 174.) Riisfeldt, O. *Acta endocr., København*, 3 (1949): 137
- 175.) Riisfeldt, O. *Endocrinology, Springfield, Ill.*, 45 (1949): 622
- 176.) Riisfeldt, O. *Nature, London*, 163 (1949): 874
- 177.) Riisfeldt, O. *Zschr. Vitamin-Hormon-Ferm. Forsch.*, Wien, 3 (1949): 66
- 178.) Rizatti, E. *Nord. med.* 42 (1949): 1892
- 179.) Rogers, O.J. *Ann. obstetr. gynec.* 73 (1951): 853
- 180.) Rössler, F. *Boll. Soc. med.-chir., Modena*, 41 (1941): 230
- 181.) Rothshild, Leon. *Boll. Soc. med.-chir., Modena*, 41 (1941): 321
- 182.) Rothshild, Leon. *Med. J.* 1947, 2: 239

- 1900.) Zbl. Cytol. 24 (1951): 1999
Nature, London, 194 (1949): 399
Persönliche Mitteilung, 244
- 1901.) Ann. N.Y. Acad. Sci. 52 (1950): 1785
- 1902.) Ireland, I.W. Amer. J. Physiol. 152 (1948): 173
Ireland, I.W. Ann. N.Y. Acad. Sci. 59 (1950): 1186
Practitioner, London, 139 (1952)
- 1903.) Mhefte Vet.med., Leipzig, 6 (1951): 389
- 1904.) Eschr. ärztl. Fortbild., Berlin, 46 (1952): 51
- 1905.) J. Amer. Med. Ass. 137 (1948): 1511
Diskussionsbemerkung zu Nr. 13.
- 1906.) Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 8 (1952): 67
- 1907.) Shurber, D.A. Birnberg, C. Endocrinology, Springfield, Ill. 1951: 20
- 1908.) Sieglar, S.L. Transact. Conf. Steril. Infert. 3 (1947): 98
- 1909.) Sieve, B.F. Science, N.Y., 116 (1952): 373
- 1910.) Simmons, F.A. Diagnosis in Sterility. Springfield (USA) 1945. Cit. nach Dr. 111
- 1911.) Stary, Z., Tekman, S. Münch. Med. Wschr. 93 (1951), Nr. 40/31
- 1912.) Stemmer, W. Ann. obstetr. gynec. 53 (1951): 988
- 1913.) Sriasny, E. Unfruchtbarkeit beim Manne. 1. Auflage. Ferdinand Enke, Stuttgart 1944.
- 1914.) Sriasny, H., Generalov, E. Erbkrankheit und Fertilität. 1. Auflage. Ferdinand Enke, Stuttgart 1937.
- 1915.) Stone, E.J., Johnston, E.I. J. dairy Sci. 33 (1950): 442
Mixner, L.F.
- 1916.) Sturgis, S.H. Transact. Conf. Steril. Infert. 3 (1947): 29
- 1917.) Lancer, London, 251 (1946): 755

- Biochem. J., Liverpool, 41 (1947): 409
 Biochem. J., Liverpool, 41 (1947)
- Nature, London, 166 (1947): 823
 Nature, London, 166 (1947): 433
 Biochem. J., Liverpool, 42 (1948)
- 211.) Tafel, E.E., Titus, P.,
 Wiegthmann, W.W.
 212.) Thullier, I.
 213.) Tronella, Dalmau, P.
 214.) Trier, T.
 215.) Trier, T.
 216.) Vandelli, J.
 217.) Vandelli, J.
 218.) Vendramini, R., Vandelli,
 J.
 219.) Vignocchi, R.
 220.) Vivien, I.H.
 221.) Veilmar, I.
 222.) Wallenfels, K.
 223.) Wallenfels, K.
 224.) Wallenfels, K., Hartner, I.,
 Bauereis, R.
 225.) Warthessen, N.T.
 226.) Warthessen, N.T.
- Amer. J. Obstetr. Gynec. 35 (1943): 1023
 Concours méd. 73 (1931): 3129
 Rev. espan. obstetr., Madrid, 11
 (1952): 5
 J. Amer. Med. Ass. 146 (1951): 307
 Ann. West. Med. Surg., Los Angeles,
 1951 : 491
 Boll. Ist. sieroter. milan. 26
 (1947): 109
 Boll. Soc. med.-chir. Modena, 47
 (1947): 9
 Boll. Ist. sieroter. milan. 25
 (1946): 133
 Boll. Soc. med.-chir. Modena, 45
 (1945): 528
 Compt. rend. Soc. biol., Paris, 144
 (1950): 578
 Dissertations, Gießen, 1944
 Österr. Chem. ztg. 43 (1940): 187
 Angew. Chemie 54 (1941): 197
 Angew. Chemie 63 (1951): 218
 Biochem. Ztschr. 313 (1947): 437
 J. Org. Chem. 14 (1949): 27
 Persönliche Mitteilung, zit.
 nach Nr. 29.

Als Sohn des damaligen Vorkurslehrers in Ludwig
Wilhelm-Institut für Zitielforschung Dr. Ing. Hermann
Heinrichs und seiner Ehefrau Anna, geb. Göttsche wurde ich,
Eberhard Heinrichs am 22. November 1925 in Berlin-Göhlen-
berg geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1933 - 1935
in Friedrichshain (Niederlausitz), von 1936 - 1938 war ich
auf dem Städtischen Reform-Realgymnasium in Forst (Saasitz)
und von 1938 - 1943 Schüler des Zinzendorf-Pädagogiums der
evangelischen Brüdergemeine Deutschlands in Niesky (Ober-
lausitz), wo ich 1943 die vorläufige Reife zugesprochen be-
kam, als ich zum Luftwaffenheferdienst eingezogen wurde.
Ab 1.4.1944 leistete ich meinen Wehrdienst als aktiver
Marinesanitätsoffiziersanwärter und wurde Ende 1945 aus
der Kriegsgefangenschaft entlassen. Mein Abitur bestand ich
am 12.4.1946 am Städtischen Realgymnasium in Wesermünde.
Zum Sommersemester 1948 wurde ich an der Georg-August-Uni-
versität in Göttingen zum Studium der Medizin immatriku-
liert und bestand hier das Physikumexamen am 27.7.1950.
Nachdem ich auch alle klinischen Semester in Göttingen
studiert habe, werde ich Ende 1953 das medizinische Staats-
examen ablegen.

Zum Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. med. R.K. Kepp und Herrn Dr. med. H.W. Vasterling meinen besten Dank sagen für die freundliche Überlassung des Themas und für die stete Bereitschaft, auf alle meine Fragen einzugehen, mich zu beraten und mich in jeder Weise zu unterstützen.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Bode, Direktor der Universitätshautklinik Göttingen, Herrn Professor Dr. Witt, Direktor des Max - Planck - Institutes für Tierernährung und Tierzucht, Mariensee, Krs. Neustadt a.Rbg., Herrn Prof. Dr. Schermer, Direktor des Tierärztlichen Institutes der Universität Göttingen und Herrn Dozenten Dr. Aehnelt, Oberassistent an der Klinik für Geburtshilfe und Rinderkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover, für ihre Unterstützung, Beratung und Überlassung von Versuchsmaterial.

Der Fa. Schering A.G., Berlin, insbesondere Herrn Dr. Gibian und Herrn Dr. Ufer, sei für die Überlassung von Versuchsmengen von Hyaluronsäure und Kinetin (Hyaluronidase "Schering") und ihre Beratung bei aufgetauchten Fragen gedankt.

